

# AVALUACIÓ DE GENS DE SUSCEPTIBILITAT A FORMES COMUNES DE MIGRANYA

Memòria presentada per  
**Roser Corominas Castiñeira**

Per optar al grau de  
**Doctora per la Universitat de Barcelona**

Programa de Genètica  
Departament de Genètica  
Bienni 2003-2005

Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** i el **Dr. Alfons Macaya Ruiz** al Laboratori de Neurologia Infantil i Psiquiatria Genètica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona.

Dr. Bru Cormand Rifà

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Roser Corominas Castiñeira

2009

# RESULTATS





# CAPÍTOL 1: Receptors hormonals

## Absència d'associació entre polimorfismes de receptors hormonals i migranya

### RESUM

*Antecedents i propòsit:* Els estudis prèviament publicats en què s'estudia la participació de variants genètiques de gens que codifiquen receptors d'hormones presenten resultats conflictius. L'objectiu d'aquest treball ha estat investigar el paper de variants polimòrfiques comunes del gen del receptor d'estrògens (*ESR1*) i del gen del receptor de progesterona (*PGR*) en el risc a patir migranya en una cohort espanyola.

*Mètodes:* En un estudi de tipus cas-control que inclou 210 pacients d'origen caucàsic amb migranya i 210 controls aparellats, s'ha examinat l'associació entre la migranya, la migranya sense aura i la migranya amb aura i tres SNPs de la regió codificant del gen *ESR1* (rs2077642, rs1801132 i rs2228480), i una inserció *Alu* del gen *PGR*. S'han comparat les freqüències genotípiques, al·lèliques i dels haplotips estimats.

*Resultats:* No s'han identificat diferències significatives entre casos i controls en les distribucions genotípiques o al·lèliques per a cap dels polimorfismes. Tampoc s'ha detectat cap haplotip sobrerrepresentat en pacients.

*Conclusions:* Aquest estudi no recolza una contribució major dels gens *ESR1* i *PRG* en la patogènesi de la migranya.

### REFERÈNCIA

Corominas R, Ribases M, Cuenca-Leon E, Cormand B, Macaya A

Lack of association of hormone receptor polymorphisms with migraine

*European Journal of Neurology* (2009) doi:10.1111/j.1468-1331.2008.02499.x

Article en premsa, disponible online

### APORTACIÓ PERSONAL A L'ARTICLE

Extracció d'ADN de casos i controls. Disseny dels assaigs. Genotipació dels polimorfismes. Anàlisi dels resultats. Elaboració del manuscrit.



Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, Cormand B, Macaya A.  
*Lack of association of hormone receptor polymorphisms with migraine.*  
Eur J Neurol. 2009 Mar;16(3):413-5.  
PMID: 19175383.



# ANNEX CAPÍTOL 1. Receptors hormonals

## 1.1 Materials i mètodes complementaris

### 1.1.1 Extracció de mostres de d'ADN

L'extracció d'ADN s'ha realitzat a partir de leucòcits de mostres de sang perifèrica recollida en tubs d'extracció de 5-10 ml anticoagulats amb EDTA, seguint un protocol basat en el mètode d'extracció salina (*salting-out*) descrit per Miller i col·laboradors (Miller et al. 1988) o utilitzant el kit d'extracció QIAGEN maxikit (QIAGEN, Hilden, GE). En alguns casos l'ADN s'ha extret a partir de mostres de saliva amb kit d'extracció d'Oragene (DNA Genotek, Ottawa, Canada).

El protocol adaptat de Miller i col·laboradors es basa en l'aïllament i lisi de leucòcits, la precipitació de l'ADN amb una solució salina saturada (NaCl 5,5M), i la seva posterior extracció amb dissolvents orgànics. Un cop precipitat i rentat l'ADN es ressuspèn en TE (Tris 10mM/EDTA 0,2mM). S'ha determinat la concentració de les mostres amb l'espectrofotòmetre Nanodrop (NanoDrop Technologies) i s'han diluït a 50 ng/μl.

### 1.1.2 Selecció de SNPs i disseny dels estudis

La cerca de SNPs s'ha realitzat *in silico*, utilitzant referències bibliogràfiques i bases de dades públiques del genoma humà: dbSNP NCBI, build 124 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) i Hapmap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). S'han seleccionat tots els SNPs exònics amb una MAF > 0,10.

S'ha utilitzat la base de dades Human Genome Browser ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)) per a l'obtenció de seqüències i la visualització dels aliniaments i del grau de conservació de les seqüències entre diferents espècies.

S'han dissenyat parelles d'encebadors per a l'amplificació per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) de regions que contenen els SNPs a estudiar amb el programa informàtic Primer3 (Rozen i Skaletsky 2000) accessible de forma gratuïta a la pàgina [webfrodo.wi.mit.edu](http://webfrodo.wi.mit.edu). Per a l'amplificació de la inserció *Alu* del gen *PGR* s'han utilitzat els encebadors dissenyats per Lancaster i col·laboradors (Lancaster et al. 1998).

Per identificar enzims de restricció amb una diana diferencial a la posició del SNP i establir els patrons de restricció dels productes de PCR, s'ha utilitzat el programa Webcutter ([rna.lundberg.gu.se/cutter2](http://rna.lundberg.gu.se/cutter2)). En absència de diana diferencial, els SNPs s'han genotipat utilitzant la tècnica d'anàlisi de polimorfismes de cadena senzilla (*Single Strand Conformation Polymorphism Analysis*, SSCP) (Orita et al. 1989).



### 1.1.3 Genotipació de polimorfismes per PCR-RFLP o PCR-SSCP

S'han amplificat els fragments d'interès a la mostra de pacients i controls mitjançant la PCR, en un volum total de 25 µl, en tampó 1x PCR (Ecogen), 50 ng d'ADN motlle, 200 µM de dNTPs (Applied Biosystems), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 pmols de cada oligonucleòtid (Sigma-Genosys) i 0,5 unitats d'EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen). Les condicions d'amplificació han consistit en 3 min de desnaturalització a 94°C, 35 cicles de 94°C durant 45 seg, 45 seg a la temperatura d'anellament pròpia de cada parella d'oligonucleòtids (taula 10) i 72°C durant 45 seg, amb una extensió final a 72°C durant 10 min. S'han sotmès 5 µl del producte de la PCR a electroforesi en gel d'agarosa al 1,5% per tal de comprovar la reacció d'amplificació.

**Taula 10.** Resum de la metodologia emprada en la genotipació dels polimorfismes dels gens *ESR1* i *PGR*.

Gen Polimorfisme	Localització Canvi de nt Canvi d'aa	Encebadors (5'-3')	Mida amplificat	T (°C)	Mètode detecció	Patrons de restricció per al.lels
<b>ESR1</b>						
rs2077647	Exó 1 c.30T>C p.Ser10ser	D: GCTGTGCTCTTTTTCCAGGT R: CGGCGTTGAACCTCGTAGG	281 pb	61º	PCR-RFLP <i>BstF5</i>	C: 118 + 6 + 157 T: 124 + 157
rs1801132	Exó 4 c.975C>G p.Pro325Pro	D: ACATGAGAGCTGCCAACCTT R: ATGTGAACCCAGCTCCCTGTC	217 pb	61º	PCR-SSCP	
rs2228480	Exó 8 c.1782G>A p.Thr594Thr	D: AGACGGACCAAAGCCACTT R: GAAAGCCATTGGTGTGGAT	227 pb	61º	PCR-RFLP <i>BtgI</i>	G: 94 + 133 A: 227
<b>PGR</b>						
Ins/del <i>Alu</i>	Intró 7	D*: GGCAGAAAGCAAATAAAAAAGA R*: AAAGTATTTTCTTGCTAAATGTC	178/479pb	54º	PCR	178 bp → del <i>Alu</i> 479 bb → ins <i>Alu</i>

nt: nucleòtid, aa: aminoàcid, D: encebador directe, R: encebador revers, T: Temperatura d'anellament, RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*, del: deleció, ins: inserció. ADNc *ESR1*: Refseq NM\_000125, (posició 1 correspon a la A de l'ATG). Proteïna *ESR1*:Refseq NP\_000116

\* Seqüència dels encebadors publicada a l'article Lancaster et al. 1998.

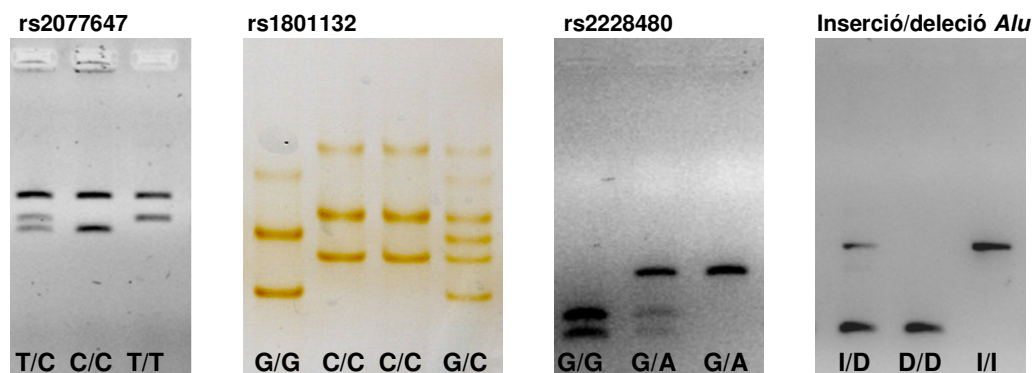
En els assaigs de polimorfismes de longitud de fragments de restricció (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, *RFLP*) s'han digerit entre 5 i 10 µl del producte amplificat amb l'enzim de restricció corresponent (New England Biolabs; Taula 10). S'han resolt els patrons de digestió mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 2% pel SNP rs2228480, i al 3% pel rs2077647 (50% agarosa MS-8 d'alta resolució, Conda-Pronadisa; figura ).

Per als assaigs de SSCP s'han diluït 6 µl del producte de la PCR en un volum idèntic de tampó de càrrega desnaturalitzant amb 95% de formamida i, un cop desnaturalitzats durant 4 min a 80°C, s'han analitzat per electroforesi en gels de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) al 12% durant 19 hores a 250V. Posteriorment s'han tenyit els gels amb nitrat de plata (Cormand et al. 1997). Abans de procedir a la genotipació es van estudiar els patrons de SSCPs en individus CEPH

portadors dels tres possibles genotips per tal d'assignar als diferents patrons de SSCP els genotips corresponents (figura 11).

El polimorfisme *Alu* (presència o absència d'una seqüència *Alu* de 301 pb en un intró del gen *PGR*) s'ha detectat mitjançant PCR amb encebadors que flanquegen la inserció *Alu*, seguint les condicions d'amplificació prèviament descrites i utilitzant una temperatura d'anellament de 54°C i un volum final de 10µl (Lancaster et al. 1998). El fragment de 479 parelles de bases (pb) indica la presència de la inserció, mentre que el de 173 pb correspon a l'absència d'inserció (figura 11).

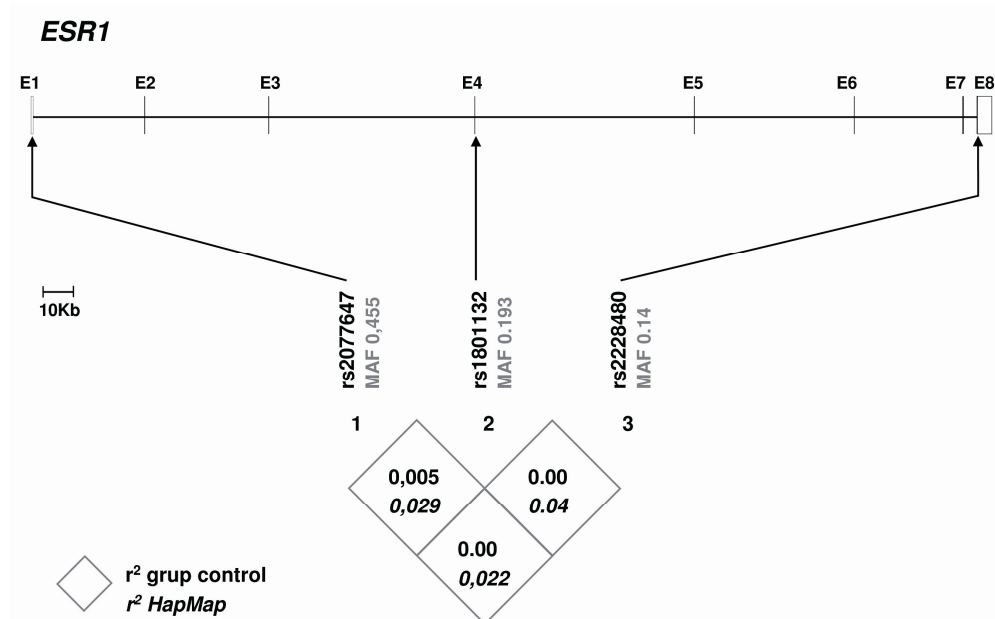
Per confirmar la correcta assignació de genotips es van seqüenciar individus portadors dels diferent patrons genotípics per a cada SNP amb el kit comercial Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) en un seqüenciador d'ADN automàtic (ABI PRISM 3700 DNA analyser, Applied Biosystems).



**Figura 11.** Canvis en els patrons de PCR-RFLP i PCR-SSCP per la genotipació dels polimorfismes dels gens *ESR1* i *PGR*. I: Inserció, D: deleció.

## 1.2 Resultats complementaris

S'han avaluat els patrons de LD entre els tres marcadors estudiats del gen *ESR1* amb el programa Haploview (Barrett et al. 2005) a la població control i s'ha confirmat que no aporten informació redundant. També s'ha observat que les MAF detectades a la nostra població control són molt similars a les descrites al HapMap: rs2077647 (0,45 *versus* 0,42 HapMap), rs1801132 (0,19 *versus* 0,18 HapMap) rs2228480 (0,14 *versus* 0,15 HapMap; figura 12).



**Figura 12.** Esquema del gen *ESR1* i localització dels SNPs inclosos en aquest estudi, patrons de desequilibri de lligament i freqüència al·lèlica mínima (MAF) a la població control (RefSeq NM\_000125).

En aquest estudi d'associació, a part de les categories clàssiques de MO i MA, també s'han realitzat les comparacions genotípiques i al·lèliques entre casos i controls segons l'edat d'inici ( $\leq 10$  anys o  $> 10$  anys) i segons el sexe. Els resultats obtinguts no són significatius i estan recollits a les taules 11 i 12, però no a la publicació corresponent a aquest capítol.

**Taula 11.** Distribució de les freqüències genotípiques i al·lèliques dels SNPs dels gens *ESR1* i *PGR* segons les categories d'edat d'inici de la migranya  $\leq 10$  anys o  $> 10$  anys versus controls.

	Genotips n (%)					Al·lèls n (%)		
	11	12	22	Suma	P	1	2	P
<b>rs2077647</b>								
$\leq 10$ anys	14 (18,9)	38 (51,4)	22 (29,7)	74	0,104	82 (55,4)	66 (44,6)	0,05
$> 10$ anys	31 (25,8)	63 (52,5)	26 (21,7)	120	0,644	125 (52,1)	115 (47,9)	0,57
CONTROLS	64 (30,5)	101 (48,1)	45 (21,4)	210		191 (45,5)	229 (54,5)	
<b>rs1801132</b>								
$\leq 10$ anys	51 (68,9)	21 (28,4)	2 (2,7)	74	0,804	123 (83,1)	25 (16,9)	0,52
$> 10$ anys	79 (65,8)	31 (25,8)	10 (8,3)	120	0,105	189 (78,8)	51 (21,3)	0,55
CONTROLS	136 (64,8)	67 (31,9)	7 (3,3)	210		339 (80,7)	81 (19,3)	
<b>rs2228480</b>								
$\leq 10$ anys	57 (77,0)	16 (21,6)	1 (1,4)	74	0,733	130 (87,8)	18 (12,2)	0,56
$> 10$ anys	84 (70,0)	33 (27,5)	3 (2,5)	120	0,581	201 (83,8)	39 (16,3)	0,50
CONTROLS	157 (74,8)	47 (22,4)	6 (2,9)	210		361 (86,0)	59 (14,0)	
<b>Inserció <i>A</i>l<i>u</i></b>								
$\leq 10$ anys	48 (64,9)	24 (32,4)	2 (2,7)	74	0,766	120 (81,1)	28 (18,9)	0,82
$> 10$ anys	83 (69,2)	33 (27,5)	4 (3,3)	120	0,948	124 (75,2)	41 (24,8)	0,08
CONTROLS	142 (67,6)	60 (28,6)	8 (3,8)	210		344 (81,9)	76 (18,1)	

rs2077647: 1=T, 2=C; rs1801132: 1=C, 2=G; rs2228480: 1=G, 2=A.

**Taula 12.** Distribució de les freqüències genotípiques i al·lèliques en els grups de migranya desglossats per sexe pels polimorfismes dels gens *ESR1* i *PGR*.

	Genotips					Al·lèls		
	22	12	11	Suma	P	2	1	P
<b>rs2077647</b>								
MIGRANYA	52 (24,8)	109 (51,9)	49 (23,3)	210	0,4234	213 (50,7)	207 (49,3)	0,2688
Dones	38 (24,8)	76 (49,7)	39 (25,5)	153	0,6250	152 (49,7)	154 (50,3)	0,3317
Homes	14 (24,6)	33 (57,9)	10 (17,5)	57	0,3083	61 (53,5)	53 (46,5)	0,5942
MO	27 (26,5)	54 (52,9)	21 (20,6)	102	0,6948	108 (52,9)	96 (47,1)	0,7099
Dones	17 (23,9)	40 (59,3)	14 (19,7)	71	0,6337	74 (52,1)	68 (47,9)	0,770
Homes	10 (32,3)	14 (45,2)	7 (22,6)	31	0,9623	34 (54,8)	28 (45,2)	0,7809
MA	20 (23,3)	44 (51,2)	22 (25,6)	86	0,4198	84 (48,8)	88 (51,2)	0,2085
Dones	17 (25,8)	29 (43,9)	20 (30,3)	66	0,3932	63 (47,7)	69 (52,3)	0,2595
Homes	3 (15,0)	15 (75,0)	2 (10,0)	20	0,0501	21 (47,5)	21 (52,5)	0,6211
CONTROLS	64 (30,5)	101 (48,1)	45 (21,4)	210		229 (54,5)	191 (45,5)	
Woman	44 (28,8)	76 (49,7)	33 (21,6)	153		164 (53,6)	142 (46,4)	
Homes	20 (35,1)	25 (43,9)	12 (21,1)	57		65 (57,0)	49 (43,0)	
<b>rs1801132</b>								
MIGRANYA	140 (66,7)	58 (27,6)	12 (5,7)	210	0,3610	338 (80,5)	82 (19,5)	0,9305
Dones	103 (67,3)	41 (26,8)	9 (5,9)	153	0,7012	247 (80,7)	59 (49,7)	0,7562
Homes	37 (64,9)	17 (29,8)	3 (5,3)	57	0,3365	91 (79,8)	23 (20,2)	0,7452
MO	72 (70,6)	25 (24,5)	5 (4,9)	102	0,3528	169 (82,8)	35 (17,2)	0,5191
Dones	52 (73,2)	17 (23,9)	2 (2,8)	71	0,6575	121 (85,2)	21 (14,8)	0,3540
Homes	20 (64,5)	8 (25,8)	3 (9,7)	31	0,1325	48 (77,4)	14 (22,6)	0,9210
MA	55 (64,0)	25 (29,1)	6 (7,0)	86	0,3948	135 (78,5)	37 (21,5)	0,5405
Dones	42 (63,6)	18 (27,3)	6 (9,1)	66	0,3341	102 (77,3)	30 (22,7)	0,2895
Homes	13 (65,0)	7 (35,0)	0 (0,0)	20	0,8453	33 (82,5)	7 (17,5)	0,5469
CONTROLS	136 (64,8)	67 (31,9)	7 (3,3)	210		339 (80,7)	81 (19,3)	
Woman	103 (67,3)	44 (28,8)	6 (3,9)	153		250 (81,7)	56 (18,3)	
Homes	33 (57,9)	23 (40,4)	1 (1,8)	57		89 (78,1)	25 (21,9)	
<b>rs2228480</b>								
MIGRANYA	154 (73,3)	52 (24,8)	4 (1,9)	210	0,7102	360 (85,7)	60 (14,3)	0,9212
Dones	110 (71,9)	40 (26,1)	3 (2,0)	153	0,6142	260 (85,0)	46 (15,0)	0,5627
Homes	44 (77,2)	12 (21,1)	1 (1,8)	57	0,7409	100 (87,7)	14 (12,3)	0,4452
MO	72 (70,6)	27 (26,5)	3 (2,9)	102	0,7258	171 (83,8)	33 (16,2)	0,4845
Dones	48 (67,6)	20 (28,2)	3 (4,2)	71	0,4270	116 (81,7)	26 (18,3)	0,1812
Homes	24 (77,4)	7 (22,6)	0 (0,0)	31	0,8163	55 (88,7)	7 (11,3)	0,4069
MA	65 (75,6)	20 (23,3)	1 (1,2)	86	0,6455	150 (87,2)	22 (12,8)	0,6845
Dones	49 (74,2)	17 (25,8)	0 (0,0)	66	0,4160	115 (87,1)	17 (12,9)	0,8826
Homes	16 (80,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	20	0,6461	35 (87,5)	5 (12,5)	0,6099
CONTROLS	157 (74,8)	47 (22,4)	6 (2,9)	210		361 (86,0)	59 (14,0)	
Woman	116 (75,8)	33 (21,6)	4 (2,6)	153		265 (86,6)	41 (13,4)	
Homes	41 (71,9)	14 (24,6)	2 (3,5)	57		96 (84,2)	18 (15,8)	
<b>Alu</b>								
MIGRANYA	142 (67,6)	62 (29,5)	6 (2,9)	210	0,8524	346 (82,4)	74 (17,6)	0,857
Dones	102 (66,7)	46 (30,1)	5 (3,3)	153	0,9922	250 (81,7)	56 (18,3)	0,917
Homes	40 (70,2)	16 (28,1)	1 (1,8)	57	0,5042	96 (84,2)	18 (15,8)	0,8574
MO	72 (70,6)	28 (27,5)	2 (2,0)	102	0,6323	172 (84,3)	32 (15,7)	0,4525
Dones	48 (67,6)	21 (29,6)	2 (2,8)	71	0,9649	117 (82,4)	25 (17,6)	0,7946
Homes	24 (77,4)	7 (22,6)	0 (0,0)	31	0,7396	55 (88,7)	7 (11,3)	0,3283
MA	56 (65,1)	27 (31,4)	3 (3,5)	86	0,8878	174 (80,6)	42 (19,4)	0,6794
Dones	45 (68,2)	19 (28,8)	2 (3,0)	66	0,9521	109 (82,6)	23 (17,4)	0,7641
Homes	11 (55,0)	8 (40,0)	1 (5,0)	19	0,3435	30 (75,0)	10 (25,0)	0,2570
CONTROLS	142 (67,6)	60 (28,6)	8 (3,8)	210		344 (81,9)	76 (18,1)	
Dones	101 (66,0)	47 (30,7)	5 (3,3)	153		249 (81,4)	57 (18,6)	
Homes	41 (71,9)	13 (22,8)	3 (5,3)	57		95 (83,3)	19 (16,7)	

rs2077647: 1=T, 2=C; rs1801132: 1=C, 2=G; rs2228480: 1=G, 2=A.



## **CAPÍTOL 2. Neurotransmissió serotoninèrgica**

### **Estudi d'associació del sistema serotoninèrgic en migranya en població espanyola**

#### **RESUM**

Amb l'objectiu d'avaluar la contribució de 19 gens relacionats amb el sistema serotoninèrgic a la susceptibilitat a migranya en població espanyola, s'ha realitzat un estudi d'associació de tipus cas-control de 122 polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNP), seleccionats seguint criteris de cobertura genètica, en 528 pacients amb migranya -308 amb migranya sense aura (MO) i 220 amb migranya amb aura (MA)- i 528 controls sense migranya aparellats per gènere. Les anàlisis dels marcadors individuals van identificar associacions nominals amb el fenotip migranyós o amb algun dels subtipus MO o MA. Les anàlisis basades en múltiples marcadors van revelar haplotips de risc en tres gens que es van mantenir significativament associats a la patologia després d'aplicar correccions per permutacions. Es van identificar haplotips de dos marcadors en els gens *HTR2B* (rs16827801T-rs10194776G) i *MAOA* (rs3027400G-rs2072743C) que confereixen susceptibilitat a MO, i un haplotip de quatre marcadors en el gen *DDC* específic per MA (rs2329340A-rs11974297C-rs2044859T-rs11761683G). Aquest estudi recolza la participació dels gens *HTR2B* i *MAOA* a la susceptibilitat a MO, mentre que *DDC* donaria susceptibilitat a MA. Aquests resultats suggereixen una participació diferencial de gens relacionats amb la neurotransmissió serotoninèrgica en el component genètic de la MO i la MA.

#### **REFERÈNCIA**

R. Corominas, M. J. Sobrido, M. Ribasés, E. Cuenca-León, P. Blanco-Arias, B. Narberhaus, M. Roig, R. Leira, J. López-González, A. Macaya, B. Cormand

Association study of the serotoninergic system in migraine in the Spanish population

*American Journal of Medical Genetics. Part B: Neuropsychiatric Genetics* (2009)

Article en premsa

#### **APORTACIÓ PERSONAL A L'ARTICLE**

Extracció d'ADN de casos i controls. Preparació de les mostres. Disseny dels assaigs de genotipació SNPlex. Anàlisis dels resultats. Elaboració del manuscrit.



Corominas R, Sobrido MJ, Ribasés M, Cuenca-León E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, Roig M, Leira R, López-González J, Macaya A, Cormand B.

*Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population.*

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):177-84.

PMID: 19455600





## ANNEX CAPÍTOL 2. Neurotransmissió serotoninèrgica

### 2.1 Materials i mètodes complementaris

#### 2.1.1 Mesures d'estratificació poblacional

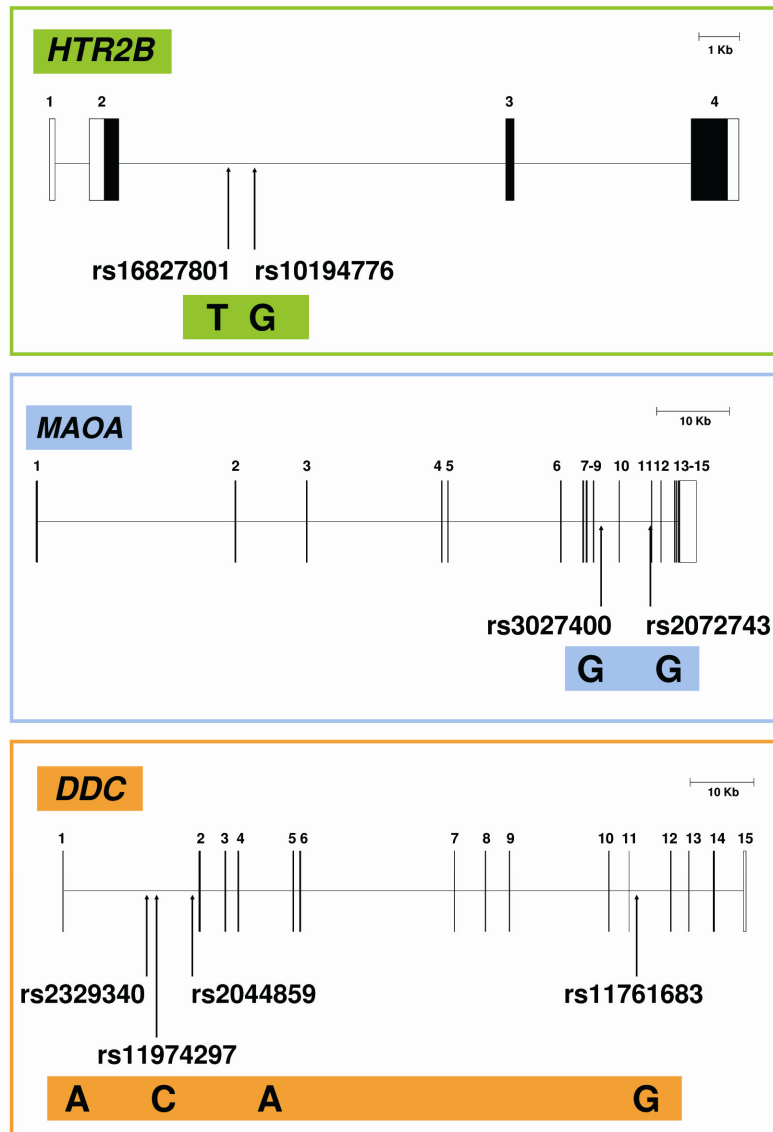
Per descartar la possible presència d'estratificació poblacional s'han estudiat els genotips obtinguts de la genotipació de 45 SNPs localitzats a més de 100 kb de qualsevol gen conegut (Sanchez et al. 2006) mitjançant tres aproximacions diferents. S'ha fet servir el programa STRUCTURE (versió 2.0) (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) sota un model de barreja (*admixture*) utilitzant 100.000 iteracions; s'han realitzat 5 simulacions independents per a cada valor de K (de 1 a 5), amb K referit al número de subgrups inferits a la població. El coeficient *Fst* s'ha calculat amb l'aproximació de Weir i Cockerman implementada pel programa FSTAT (Goudet 1995) amb uns intervals de confiança al 99% determinats per *bootstrapping*. També s'ha utilitzat el mètode de Pritchard i Rosenberg (Pritchard i Rosenberg 1999) per contrastar si la distribució dels genotips per a cada un dels marcadors (sota els models codominant, dominant i recessiu) són les mateixes entre el grup de casos i de controls, avaluant al final de forma global el conjunt de marcadors.

#### 2.1.2 Anàlisis de múltiples marcadors

Per a cada gen, en lloc de limitar l'estudi d'haplotips als SNPs físicament contigus, s'ha identificat la millor combinació haplotípica de dues variants entre totes les combinacions possibles. De la mateixa manera s'han anat afegint variants successivament (fins a 5 SNPs) a la combinació haplotípica inicial de dos marcadors, tot valorant estadísticament si l'addició de nous polimorfismes millora el model anterior. El millor haplotip de dos, tres, quatre o cinc SNPs identificat per a cada gen en un determinat subgrup fenotípic (MO o MA) s'ha comparat amb l'altre grup (MA o MO). En tots els casos, el nivell de significació s'ha estimat per un procés de permutacions utilitzant 10.000 permutacions amb el programa UNPHASED (Dudbridge 2003). Com que l'algoritme implementat en el programa UNPHASED no és capaç d'estimar acuradament els haplotips de baixa freqüència (Fallin i Schork 2000), s'han exclòs els haplotips amb freqüència  $<0,05$ . L'assignació individual d'haplotips específics s'ha realitzat considerant casos i controls per separat amb el programa PHASE (Stephens et al. 2001).

## 2.2 Resultats complementaris

La figura 13 mostra un esquema dels gens *HTR2B*, *MAOA* i *DDC*, en què s'han detectat variants associades a diferents formes de migranya, amb la localització dels SNPs dels haplotips de risc.



**Figura 13.** Esquema del gens *HTR2B*, *MAOA* i *DDC* i localització dels SNPs que formen part dels haplotips de risc identificats (RefSeqs NM\_000867.3, NM\_000240 i NM\_001082971, respectivament)

## **CAPÍTOL 3. Neurotransmissió dopaminèrgica**

### **Estudi d'associació cas-control en dues etapes del sistema dopaminèrgic en migranya**

#### **RESUM**

*Objectiu:* En un estudi previ vam identificar haplotips de risc en gens relacionats amb el metabolisme de la serotonina i la dopamina: al gen *MAOA* per a la migranya sense aura i a *DDC* per a la migranya amb aura. En aquest treball s'ha avaluat la susceptibilitat a migranya de 9 gens més relacionats amb la neurotransmissió dopaminèrgica.

*Mètodes:* S'han realitzat estudis d'associació de tipus cas-control per a 64 polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs) seleccionats seguint criteris de cobertura genètica, utilitzant un disseny en dues etapes. El primer grup d'estudi va consistir en 263 pacients i 274 controls i l'estudi de rèplica estava format per 258 casos i 287 controls. Tots els pacients complien estrictament els criteris diagnòstics ICHD-II, eren caucàsics d'origen espanyol i estaven aparellats per gènere amb el grup control.

*Resultats:* L'estudi de marcadors individuals a la primera població va permetre identificar associacions nominals entre els gens *DRD2* (rs2283265) i *TH* (rs2070762) i el fenotip migranyós que es mantenien significatives en aplicar una correcció FDR al 10%. L'estudi de marcadors múltiples va identificar un haplotip de risc de 5 variants (rs12363125T-rs2283265C-rs2242592G-rs1554929C-rs2234689G) en el gen *DRD2* que es mantenia significatiu després d'aplicar correccions per permutacions. Malauradament, aquests resultats no es van replicar a la segona cohort independent.

*Conclusions:* Aquest estudi no recolza la participació dels gens *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD5*, *DBH*, *COMT*, *SLC6A3* o *TH* en la predisposició genètica a la migranya.

#### **REFERÈNCIA**

R. Corominas, M. Ribasés, M.J. Sobrido, E. Cuenca-León, B. Cormand, A. Macaya

Two-stage case-control association study of dopamine-related genes and migraine

Manuscrit en preparació. S'enviarà a una revista internacional.

#### **APORTACIÓ PERSONAL A L'ARTICLE**

Extracció d'ADN de casos i controls. Preparació de les mostres. Disseny dels assaigs de genotipació SNPlex. Anàlisi dels resultats. Elaboració del manuscrit.



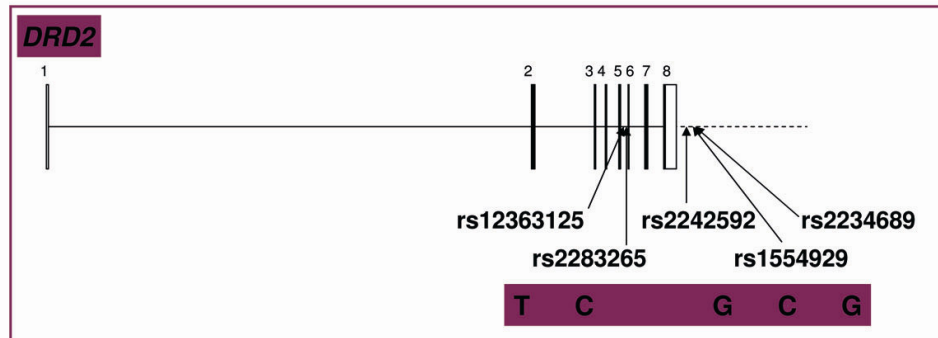
Corominas R, Ribasés M, Sobrido MJ, Cuenca-León E, Cormand B, Macaya A.  
*Two stage case-control association study of dopamine-related genes in migraine.*  
BMC Med Genet. 2009 Sep 21;10:95.  
PMID: 19772578



## ANNEX CAPÍTOL 3. Neurotransmissió dopaminèrgica

### 3.1 Resultats complementaris

La figura 14 mostra un esquema del gen *DRD2* amb la localització dels SNPs de l'haplotip de risc identificat a la població 1 que no ha estat replicat a la segona població.



**Figura 14.** Esquema del gens *DRD2* i dels SNPs que formen part de l'haplotip de risc identificat a la població 1 (RefSeqs NM\_000795).

S'ha realitzat una comparació dels resultats obtinguts en el nostre estudi i en el treball de Todt i col·laboradors (Todt et al. 2009) en comparar les freqüències al·lèliques de casos *versus* controls en 9 gens amb el sistema dopaminèrgic. Les caselles marcades amb color corresponen a SNPs comparables entre els dos estudis ( $r^2 > 0.85$ ).

**Taula 13.** Comparació dels resultats obtinguts en el nostre estudi i en el treball de Todt i col·laboradors (Todt et al. 2009) en comparar les freqüències al·lèliques de casos *versus* controls en 9 gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic. Aquest estudi: població 1: 273 casos/285 controls, població 2: 272 casos/302 controls; Estudi Todt i col·laboradors: població 1: 272 casos MA/270 controls, població 2: 380 casos MA/378 controls.

Aquest estudi (MO+MA)						Estudi Todt (MA)				
Gen SNPs	MAF cont 1	LD	Raó exclusió	P al·lèls pob 1	Hap Risc	P al·lèls pob 2	SNPs estudiats	MAF cont 1	P al·lèls pob 1	P al·lèls pob 2
<b><i>DRD1</i></b>										
rs4867798		S	Falla				-			
rs251937	0,32	M		<b>0,026</b>		0,93	-			
rs11749676	0,34	M		0,49		NA	rs686	0,42	0,73	NA
rs835540	0,29	S		0,15		NA	-			
rs835616	0,28	S		0,38		NA	-			
rs835541	0,47	S		0,65		NA	-			
rs863126	0,37	S		0,12		NA	-			
rs265977	0,17	S		0,50		NA	-			
-			MAF<0.15				rs5326	0,12	0,442	NA



## Resultats capítol 3

<b>DRD2</b>									
rs4630328	0,40	M		0,14	NA	-			
rs7131056	0,41	S		0,24	NA	rs7131056 <sup>b</sup>	0,39	<b>0,0023</b>	0,13
rs4245146	0,50	M		0,23	NA	-			
rs17529477	0,36	S		0,35	NA	-			
rs2002453	0,20	M		0,93	NA	-			
rs12363125	0,35	M		<b>0,04</b>	<b>x</b>	0,58	rs2587548	0,38	0,12 0,87
rs2283265	0,15	S		<b>0,003</b>	<b>x</b>	0,36	-		
rs2242592 <sup>a</sup>	0,25	M		0,13	<b>x</b>	NA	rs6279	0,32	0,23 0,11
rs1554929	0,41	M		0,80	<b>x</b>	NA	-		
rs2234689	0,17	S		0,49	<b>x</b>	NA	-		
-			MAF<0,15				rs7125415	0,08	0,37 0,27
-			MAF<0,15				rs4581480	0,09	0,58 0,30
<b>DRD3</b>									
rs9825563	0,31	S		0,24	NA	-			
rs1800828		S	LD rs10934256	NA		-			
rs6280	0,33	M		0,19	NA	-			
rs10934256	0,22	M		0,16	NA	rs10934256	0,16	0,40	NA
rs167770		M	LD rs6280	NA		rs167770	0,24	0,91	NA
rs167771	0,17	S		0,67	NA	-			
rs324035		S	LD rs167771	NA		-			
rs9880168	0,12	S		0,76	NA	-			
rs2134655	0,25	S		0,30	NA	-			
rs3732790	0,4	M		<b>0,017</b>	0,75	rs963468	0,46	0,19	NA
rs2399496		M	Falla			-			
<b>DRD4</b>									
rs3758653		S	No SNPlex			rs3758653	0,14	0,12	NA
rs936465		M	Falla			-			
<b>DRD5</b>									
rs2227850	0	S	Monomòrfic			-			
rs10033951	0,32	M		0,48	NA	rs10033951	0,31	0,40	NA
<b>COMT</b>									
rs2020917	0,32	M		0,47	NA	-			
rs933271	0,33	M		0,22	NA	rs933271	0,26	0,15	NA
rs1544325	0,34	M		0,06	NA	-			
rs740603	0,36	S		0,52	NA	rs740603	0,48	0,32	NA
rs740601	0,46	M		0,56	NA	-			
rs4680		S	Falla			rs4680	0,46	0,31	
rs4646316	0,26	S		0,18	NA	rs4646316	0,22	0,86	
rs174696		S	No SNPlex			-			
rs165774	0,28	S		0,87	NA	rs165774	0,33	0,64	NA
rs9332377	0,18	S		0,85	NA	-			
-			MAF<0.25				rs4485648	0,17	0,16 NA
-			MAF<0.25				rs5993889	0,002	0,32 NA
<b>DBH</b>									
rs2007153	0,35	S		0,63	NA	rs2007153	0,41	0,88	0,82
rs2797851	0,36	M		0,97	NA	rs2797849	0,36	0,38	0,37
rs1548364	0,45	M		0,32	NA	rs2873804	0,41	0,52	0,81
rs2797855	0,41	M		0,74	NA	-			
rs1541332	0,42	S		0,31	NA	rs1541332	0,42	0,93	0,73

rs2519154	0,46	S		0,65	NA	-			
rs2797853	0,38	S		0,56	NA	rs2797853	0,38	0,17	NA
rs6479643	0,39	S		0,48	NA	-			
rs2097628		M	No SNPlex		NA	rs2097629 <sup>c</sup>	0,35	<b>0,0009</b>	0,15
rs77905	0,48	S		0,98	NA	-			
rs2073833	0,40	S		0,84	NA	-			
rs1611131	0,29	S		0,50	NA	rs1611131	0,27	<b>0,0124</b>	0,55
rs129883		S	Falla			-			
rs129915		S	No SNPlex			-			
-			No HapMap			Microsatel·lit	0,45	0,35	0,85
-			No HapMap			19bp insdel	0,49	0,30	0,88
-			MAF<0.25			rs1076153	0,17	0,98	0,15
-			MAF<0.25			rs3025388	0,20	0,93	0,19
-			MAF<0.25			rs1108581	0,24	0,97	0,31
-			MAF<0.25			rs129882	0,19	0,27	0,54
<b>SLC6A3</b>									
rs2617605		S	Falla			-			
rs460700		M	Falla			rs463379	0,21	0,96	0,59
rs37020	0,40	M		0,91	NA	rs37020	0,44	0,60	0,45
rs13161905	0,43	S		0,95	NA	-			
rs27048	0,38	S		0,56	NA	rs27048	0,46	0,55	0,96
rs6347		S	Falla			-			
rs11133767		S	Falla			-			
rs40184	0,47	S		0,89	NA	rs40184 <sup>d</sup>	0,46	0,68	<b>0,0018</b>
rs2975292		S	No SNPlex			-			
-			MAF<0.25			rs37022	0,17	0,29	0,46
-			MAF<0.25			rs403636	0,11	0,08	0,66
-			MAF<0.25			rs3756450	0,12	0,37	0,37
-			MAF<0.25			rs2078247	0,27	0,35	0,80
<b>TH</b>									
rs10770140		M	Falla			-			
rs6356	0,34	S		0,45		rs6356	0,35	0,62	NA
rs2070762	0,43	S		<b>0,011</b>	0,28	rs2070762	0,49	0,72	NA
-			No HapMap			rs6357	0,33	0,52	NA

En color, els marcadors comparables entre els dos estudis. MA: migranya amb aura; Cont: controls; MAF: freqüència al·lèlica mínima; LD: desequilibri de lligament; M: SNP representatiu d'un bin (*multitag*); S: bin amb un únic SNP (*singleton*), Hap: haplotip; X: SNPs que formen part de l'haplotip de risc; Pob: població; NA: no analitzat. <sup>a</sup> variant en LD amb rs6275 (Ncol, exó 6) objecte de múltiples estudis. <sup>b</sup> En ajuntar població 1+2 P=0,0018. <sup>c</sup> En ajuntar població 1+2 P=0,0012. <sup>d</sup> En ajuntar població 1+2 P=0,0082.



## CAPÍTOL 4. Neurosecreció sinàptica (I)

### Contribució de la syntaxina 1A a la susceptibilitat genètica a migranya: estudi d'associació cas-control en població espanyola

#### RESUM

La migranya és un trastorn neurològic comú a la població amb una herència complexa. S'han identificat mutacions en gens que codifiquen proteïnes implicades en el transport de ions a través de les membranes neuronals en individus amb formes rares i monogèniques de migranya. Aquests o altres gens i proteïnes relacionades són també bons candidats a participar en la predisposició a les formes més comunes de migranya sense aura (MO) o migranya amb aura (MA). Una d'aquestes proteïnes, la syntaxina 1A, codificada pel gen *STX1A*, és una molècula clau en la regulació de canals iònics i l'exocitosi sinàptica. Hem estudiat la contribució del gen *STX1A* a la migranya analitzant tres SNPs que cobreixen tot el gen (rs6951030-rs941298-rs4363087), mitjançant un estudi d'associació de tipus cas-control de 210 pacients (102 amb MO, 86 amb MA, i 22 amb migranya hemiplègica) i 210 controls aparellats per sexe. Les anàlisis dels marcadors individuals ha revelat diferències significatives entre casos i controls en les freqüències al·lèliques ( $P=0,0087$ ,  $OR=1,48$ ) i en les distribucions genotípiques ( $P=0,0133$ ) del SNP rs941298, amb una sobrerrepresentació de portadors de l'al·lel T en el grup de migranyosos ( $OR=1,78$ ). Posteriorment s'han realitzat les anàlisis basades en haplotips i s'han observat evidències de sobrerrepresentació de la combinació al·lèlica A-T-G (rs6951030-rs941298-rs4363087) en pacients migranyosos i un augment de la freqüència de portadors de l'haplotip de risc ( $P=0,0008$ ;  $OR=1,71$ ). Aquestes diferències s'han mantingut significatives quan els pacients s'han dividit en MO i MA. En ampliar la mostra de controls per al marcador rs941298, s'ha confirmat l'associació tan sols en el grup total de migranya.

#### REFERÈNCIA

R. Corominas, M. Ribasés, E. Cuenca-León, B. Narberhaus, S.A. Serra, M. del Toro, M. Roig, J.M. Fernández-Fernández, A. Macaya, B. Cormand

Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: a case-control association study in the Spanish population

*Neuroscience Letters* (2009) doi:10.1016/j.neulet.2009.03.011

Article en premsa, disponible online



Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, Narberhaus B, Serra SA, del Toro M, Roig M, Fernández-Fernández JM, Macaya A, Cormand B.

*Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: a case-control association study in the Spanish population.*

Neurosci Lett. 2009 May 15;455(2):105-9.

Epub 2009 Mar 6.

PMID: 19368856.



## ANNEX CAPÍTOL 4. Neurosecreció sinàptica (I)

### 4.1 Materials i mètodes complementaris

#### 4.1.1 Mostres d'ADN

En aquest treball s'han estudiat els mateixos individus que a l'article 1.

#### 4.1.2 Selecció de SNPs i disseny dels estudis

La selecció de SNPs en el gen *STX1A* s'ha realitzat *in silico*, utilitzant les bases de dades dbSNP NCBI, build 124 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) i Hapmap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). S'han descarregat les dades genotípiques dels individus d'origen europeu (població CEU) genotipats en el marc del projecte HapMap i mitjançant el programa LD-select (Carlson et al. 2004), tot fixant el llindar de  $r^2$  a  $>0,85$  i incloent SNPs amb  $MAF > 0,10$ , s'han seleccionat els SNPs representatius de bins rs941298 i rs4363087, i el SNP únic (*singleton*) rs6951030 per aconseguir una millor cobertura gènica.

Per altra banda, es va decidir iniciar també l'anàlisi del gen *SNAP25*, que codifica per la proteïna SNAP25 que en acoblar-se a la sintaxina 1A formen un complex anomenat t-SNARE que s'encarrega de regular l'exocitosi sinàptica, i es van incloure dos SNPs en aquest estudi basat en genotipació manual: rs362990, rs4813925. La decisió d'incloure aquest gen en futurs estudis a més gran escala utilitzant la tecnologia SNPlex (Tobler et al. 2005) va fer que finalment es decidís no continuar la genotipació manual dels altres SNPs representatius dels diferents bins identificats per LD-select. A causa de la pobra cobertura d'aquest gen respecte a *STX1A*, les dades obtingudes d'aquests marcadors no es van incloure a la publicació.

El disseny dels experiments s'ha realitzat seguint la metodologia descrita a l'article 1.

#### 4.1.3 Genotipació de polimorfismes per PCR-RFLP o PCR-SSCP

Els fragments resultants s'han amplificat a la mostra de pacients i controls per PCR, en un volum total de 25  $\mu$ l, amb tampó 1x PCR, 50 ng d'ADN motlle, 200  $\mu$ M de dNTPs (Applied Biosystems), 2 mM de  $MgCl_2$ , 2,5 pmols de cada oligonucleòtid (Sigma-Genosys) i 0,5 unitats d'EcoTaq ADN polimerasa (Ecogen), excepte pel rs4813925, en què s'ha utilitzat l'AmpliTaQ Gold (Applied Biosystems). Les condicions d'amplificació han consistit en 3 min de desnaturalització a 94°C, 32-35 cicles de 94°C durant 45-60 seg, 45-60 seg a la temperatura d'anellament pròpia de cada parella d'oligonucleòtids (taula 14) i 72°C durant 45-60 seg, amb una extensió final a 72°C durant 10 min. S'han sotmès 5  $\mu$ l del producte de la PCR a electroforesi en gel d'agarosa al 1,5% per tal de comprovar la reacció d'amplificació.



## Resultats capítol 4.I

La genotipació del SNP rs4363087 s'ha realitzat mitjançant PCR-RFLP digerint 8-10 µl del producte amplificat amb l'enzim de restricció *MspI* (New England Biolabs; Taula 14). Per resoldre els patrons de digestió s'ha emprat electroforesi en gel d'agarosa al 4% (50% agarosa MS-8 d'alta resolució, Conda-Pronadisa; figura 14).

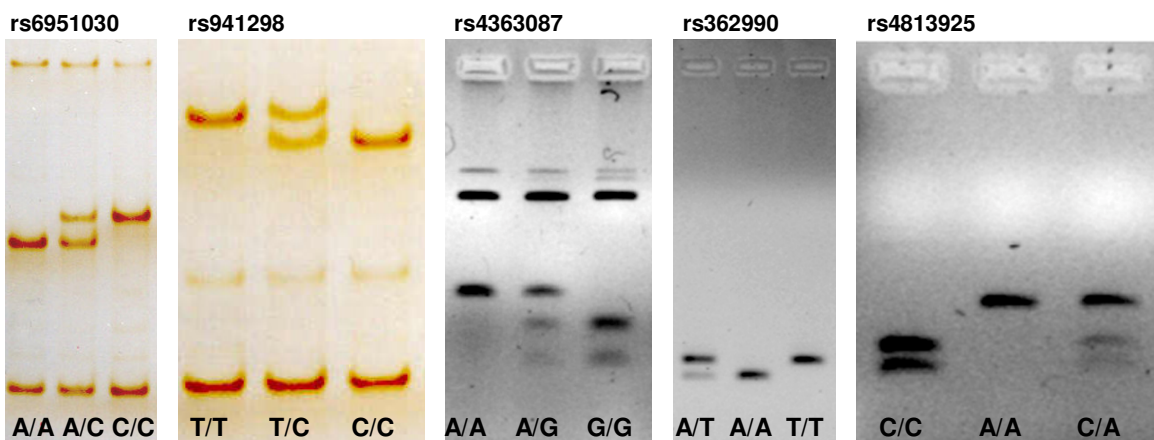
Els altres SNPs s'han analitzat per SSCP tal com s'ha descrit a l'article 1.

També s'han seqüenciat els diferents patrons electroforètics obtinguts per a cadascun dels SNPs per confirmar l'assignació correcta dels genotips seguint el protocol descrit a l'article 1.

**Taula 14.** Resum de la metodologia emprada per la genotipació dels polimorfismes dels gens *STX1A1* i *SNAP25*.

Gen SNP	Lolització Posició (nt)	Canvi	Encebadors (5'-3')	Mida amplificat	T (°C)	Mètode detecció	Patrons al·lèlics
<b>STX1A</b>							
rs6951030	Intró 1 11166585	C/A	D:CCCGGTCCACCTATCCAC R:GTCCTCTGGGCTGGGAGAAG	203 bp	63°	PCR-SSCP	
rs941298	Intró 1 11158607	C/T	D:GGGAGTTATGATTGTGCCACT R:CATCAGGCTGGGCCTTAAC	209 pb	65°	PCR-SSCP	
rs4363087	Intró 6 11151540	G/A	D:CCAATGCTGCTGCTGAACT R:ACCTGCCTTACAAGGGTCT	250 bp	63°	PCR-RFLP <i>MspI</i>	G: 22 + 41 + 187 A: 63 + 187
<b>SNAP25</b>							
rs362990	Intró 5 10216221	A/T	D:AGTTTGGGGATCTCGTTTCA R:TGGCTCTAATACTTGCAGACTGG	178 bp	61°	PCR-RFLP <i>BsrI</i>	A: 132 + 28 + 18 T: 160 + 18
rs4813925	Intró 7 10226313	C/A	D:GCATCAGAGCAAGACCCTGT R:AGGATTGAAACCATGGCTAA	212 bp	57°	PCR-RFLP <i>BsmAI</i>	A: 23 + 197 C: 23 + 124 + 73

nt: nucleòtid, D: encebador directe, R: encebador revers, T: Temperatura d'anellament, RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, SSCP: *Single Strand Conformation Polymorphism*. *STX1A*: Refseq NT\_007758, *SNAP25*: RefSeq NT\_003081.



**Figura 15.** Canvis en els patrons de PCR-RFLP i PCR-SSCP en la genotipació dels polimorfismes dels gens *STX1A1* i *SNAP25*.

## 4.2 Resultats complementaris

En comparar les distribucions genotípiques i al·lèliques dels SNPs rs362990 i rs4813925 del gen *SNAP25* entre casos i controls, no es van observar diferències significatives (Taula 15).

**Taula 15.** Distribució de les freqüències genotípiques i al·lèliques dels SNPs del gen *SNAP25*.

	Genotips n (%)					Al·lèls n (%)		
	11	12	22	Suma	P	1	2	P
<b>rs362990</b>								
MIGRANYA	118 (56,2)	76 (36,2)	16 (7,6)	210	0,7825	312 (74,3)	108 (25,7)	0,5844
MO+MA	105 (55,9)	70 (37,2)	13 (6,9)	188	0,6355	280 (74,5)	96 (25,5)	0,555
MO	59 (57,8)	35 (34,3)	8 (7,8)	102	0,8287	153 (75,0)	51 (25,0)	0,5264
MA	46 (53,5)	35 (40,7)	5 (5,8)	86	0,4750	127 (73,8)	45 (26,2)	0,7614
CONTROLS	115 (54,8)	75 (35,7)	20 (9,5)	210		305 (72,6)	115 (27,4)	
<b>rs4813925</b>								
MIGRANYA	90 (42,9)	96 (45,7)	24 (11,4)	210	0,5553	276 (65,7)	144 (34,3)	0,3140
MO+MA	81 (43,1)	85 (45,2)	22 (11,7)	188	0,6028	247 (65,7)	129 (34,3)	0,3312
MO	45 (44,1)	46 (45,1)	11 (10,8)	102	0,5506	136 (66,7)	68 (33,3)	0,2945
MA	36 (41,9)	39 (45,3)	11 (12,8)	86	0,8805	111 (64,5)	61 (35,5)	0,6215
CONTROLS	83 (39,5)	96 (45,7)	31 (14,8)	210		262 (62,4)	158 (37,6)	

rs362990: 1=A, 2=T; rs4813925 1=C, 2=A



## **CAPÍTOL 4. Neurosecreció sinàptica (II)**

### **Exocitosi sinàptica i migranya: estudi d'associació del complex SNARE i gens relacionats en població espanyola**

#### **RESUM**

La migranya és un trastorn neurològic complex i multifactorial. S'ha proposat que alteracions dels nivells iònics i/o de neurotransmissors de l'espai sinàptic poden jugar un paper important en la fisiopatologia de la migranya tot influint l'excitabilitat neuronal. L'objectiu d'aquest estudi va ser investigar la participació de 15 gens que codifiquen proteïnes reguladores de la neurotransmissió mitjançant un estudi d'associació de tipus cas-control en 538 pacients amb migranya, 312 amb migranya sense aura (MO) i 226 amb migranya amb aura (MA), i 538 controls aparellats. Es van detectar diverses associacions nominals a cada grup, però tan sols dos SNPs de gen *CPLX2* en el grup de MO i un SNP del gen *NSF* en el grup de MA es mantenen significativament associats després d'aplicar una correcció FDR al 15% per múltiples comparacions. Es va detectar un increment de quatre vegades del risc de patir MO als portadors de la combinació al·lèlica rs17065535G-rs6887620G-rs10866692G en el gen *CPLX2*. També es va detectar l'haplotip de risc rs183211G-rs17692129C al gen *NSF*, que incrementa el risc de MA als portadors en 1,95, tot i que el risc dels portadors de rs183211G era superior (OR=3,03). La identificació de *NSF* com a possible factor genètic de susceptibilitat a MA i el fet que l'homòleg en rates s'hagi identificat com a gen relacionat amb epilèpsia recolzen la hipòtesi de que alteracions en components de la maquinària d'exocitosi sinàptica estan implicats en l'etiologia d'alguns trastorns neurològics paroxístics. Calen més estudis per confirmar la participació d'aquests gens en la susceptibilitat a migranya.

#### **REFERÈNCIA**

Els resultats d'aquest article estan pendants de ser replicats en una segona mostra.

Un cop realitzats aquests estudis s'enviarà a una revista internacional.

#### **APORTACIÓ PERSONAL A L'ARTICLE**

Extracció d'ADN de casos i controls. Preparació de les mostres. Disseny dels assaigs de genotipació SNPlex. Anàlisi dels resultats. Elaboració del manuscrit.



## SYNAPTIC EXOCYTOSIS AND MIGRAINE: ASSOCIATION STUDY OF THE SNARE COMPLEX AND RELATED GENES IN A SPANISH POPULATION

Corominas et al.

### ABSTRACT

Migraine is a complex multifactorial neurological disorder. It has been suggested that disturbances of ions and/or neurotransmitter levels in the synaptic cleft may play an important role in migraine pathophysiology by influencing neuronal excitability. The aim of the present study was to investigate the involvement of 15 genes encoding proteins that regulate neurotransmission in a case-control association study of 538 migraine patients, 312 without aura (MO) and 226 with aura (MA), and 538 sex-matched controls. Several nominal associations were identified in each group, but only two SNPs in *CPLX2* for MO and one SNP in *NSF* for MA remained significant after 15% FDR corrections for multiple testing. A four-fold risk to suffer MO was identified for the carriers of the rs17065535G-rs6887620G-rs10866692G allelic combination at *CPLX2*. Also, the rs183211G-rs17692129C haplotype in the *NSF* gene confers carriers a 1.95-fold risk to develop MA, although the risk is higher for the rs183211G carriers (OR=3.03). The identification of *NSF* as a putative risk factor for MA and the fact that the rat homologue has been identified as an epilepsy-related gene support the hypothesis that alterations in components of the synaptic exocytosis machinery are involved in the etiology of some paroxysmal disorders. Further studies are required to confirm the participation of these genes in migraine susceptibility.

## INTRODUCTION

Migraine is a highly prevalent neurological disorder with a complex inheritance pattern (Wessman et al., 2007). Typical episodes are characterized by unilateral, pulsating and disabling headache associated with photophobia and phonophobia, nausea or vomiting. According to the international classification of headache disorders (ICHD-II), the two main types of migraine are migraine without aura (MO) and migraine with aura (MA), distinguished by the presence of transient neurological disturbances (IHS 2004). The precise mechanisms underlying the pathogenesis of migraine are not completely understood (Hargreaves 2007; Moskowitz 2007). It has been suggested that central neuronal hyperexcitability is an essential disturbance in migraine predisposition (Hargreaves 2007). Interestingly, mutations in *CACNA1A*, *ATP1A2* and *SCN1A* genes have been identified in patients presenting hemiplegic migraine (HM), a rare mendelian form of MA which involves motor weakness (Pietrobon 2007). These genes encode proteins involved in ion transport, suggesting that disturbances of ions and/or neurotransmitter levels in the synaptic cleft may play an important role in migraine pathophysiology by influencing neuronal excitability (Pietrobon and Striessnig, 2003). Recently, a powered study investigated the role of 155 ion channels in common forms of migraine through a two-stage association-study design but failed to replicate the initial positive results (Nyholt et al., 2008). However, other genes involved in neurotransmission or in its regulation may be suitable candidates for migraine susceptibility and warrant evaluation.

Years of research in neurotransmitter release have shown that the key role of membrane fusion processes in neurons is the Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor (SNARE) complex, and that many factors participate in the regulation of this complex assembly of elements, although the exact mechanisms of action are not well-established yet (Rizo and Rosenmund, 2008; Yoon and Shin, 2008). In neurotransmission, the SNARE complex is composed by syntaxin 1A and SNAP25 (synaptosome-associated protein of 25kDA) on the presynaptic plasma membrane (t-SNARE) and synaptobrevin/VAMP (Vesicle Associated Membrane Protein) on the synaptic vesicle membrane (v-SNARE) (Carr and Munson, 2007; Ungar and Hughson, 2003). The assembly of the SNARE motifs (one from syntaxin 1A and synaptotagmin/VAMP, and two from SNAP25) forms a parallel four-helix bundle and brings the vesicle and plasma membrane to proximity with the energy required for fusion (Malsam et al., 2008; Rizo and Rosenmund, 2008). Diverse proteins with the ability to bind SNAREs regulate the formation of such complexes as Munc18.1, synaptophysin or synaptophilin, among others (Malsam et al., 2008; Yoon and Shin, 2008). The final fusion regulatory step is achieved by synaptotagmin, acting as the

primary  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, and complexin. They initially bind the t-SNARE in the developing v-/t-SNARE complexes and subsequently cause  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent structural rearrangements triggering the opening of the fusion pore (Malsam et al., 2008). Interestingly, complexins play a dual role: to clamp the SNARE complex in a pre-fusion state preventing premature fusion in the absence of  $\text{Ca}^{2+}$ ; and to accelerate the late fusion steps improving the activity of synaptotagmin when it is  $\text{Ca}^{2+}$ -bound (Carr and Munson, 2007; Malsam et al., 2008; Yoon and Shin, 2008). SNARE complexes, which remain in a stable conformation after fusion, are disassembled by NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor) through its ATPase activity, mediating the reactivation of these proteins and preventing the accumulation of post-fusion complexes (Rizo and Rosenmund, 2008; Zhao et al., 2007). As NSF does not bind directly to SNAREs, cofactors are required, the most abundant of them being  $\alpha$ -SNAP ( $\alpha$  Soluble NSF Attachment Protein). Moreover, in the absence of NSF,  $\alpha$ -SNAP strongly inhibits fusion through the binding of free syntaxin 1 molecules (Barszczewski et al., 2008).

A previous study in syntaxin 1A gene (*STX1A*) identified nominal associations between MO and MA and the single-marker rs941298 and the three-SNP haplotype rs6951030A-rs941298T-rs4363087G, although the results did not remain significant after applying the stringent Bonferroni corrections (Corominas et al., 2009). In the present study we aimed to evaluate the participation of 15 genes related with neurotransmitter release, including *STX1A*, in migraine susceptibility using a full SNP coverage approach in a Spanish sample of 538 cases and the same number of controls.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Samples*

The clinical sample consisted originally of 570 Caucasian patients with migraine recruited in three centers of Spain (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia; Hospital Sant Joan de Déu, Manresa, Catalonia; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Galicia) between 2002 and 2007, 78% were females and the average age at assessment was 37 years (s.d.=16.5; range 5-86). All subjects fulfilled the International Criteria for Headache Disorders 2nd edition (ICHD-II, (IHS 2004)) for migraine and were diagnosed by a neurologist as having MO (n=312, 58%) or MA (n=226, 42%). HM patients, usually showing monogenic inheritance, were excluded. Diagnosis was blind to genotype. The control sample consisted of 571 Caucasian Spanish unrelated adult subjects, matched for sex frequency with patients and in whom migraine and positive family history of migraine



## Resultats capítol 4.II

was excluded, with an average age of 55 years (s.d.=17.6; range 20-96). 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.

### *DNA isolation and quantification*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by a salting-out procedure (Miller et al., 1988), the QIAGEN maxikit or the QUIAamp DNA Minim Kit (QIAGEN, Hilden; GE) or with the Chemagic Magnetic Separation Module I and Chemagic DNA kit (Chamgen AG, Baesweiler, Germany). Otherwise, DNA was isolated from saliva using the Oragene extraction kit (DNA Genotek, Ottawa, Canada). The double strand DNA concentrations of all samples were determined on a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, LLC, Delaware, USA) and on a Gemini XPS fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the PicoGreen dsDNA Quantification Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), following manufacturer indications.

### *Gene selection*

The fifteen candidate genes selected in the present study encode proteins that play significant roles in the vesicular release of neurotransmitters at the synapse. The neuronal core complex proteins syntaxin, SNAP25 and synaptobrevin are encoded by *STX1A*, *SNAP25* and *VAMP1* or *VAMP2*, respectively; the fusion control elements synaptotagmins and complexins are encoded by *SYT1* or *SYT2*, and *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* or *CPLX4*. Other genes encoding regulatory elements that interact with SNARE complex proteins were also included: *STXBP1* (encoding Munc18.1), *SYP* (synaptophysin), *SNPH* (syntaphilin), *NSF* and *NAPA* ( $\alpha$ SNARE).

### *SNP selection and SNPlex design*

In order to capture the majority of the haplotypic diversity present in Europeans, SNP selection was based on genetic coverage parameters. Genotyping data of CEU population for each candidate gene plus 5kb flanking sequences upstream and downstream were downloaded from the HapMap database (HapMap data release 22/phase II Apr07, dbSNPb126) (Thorisson et al., 2005). To minimize redundancy, linkage-disequilibrium (LD) was evaluated using the Haploview software (Barrett et al., 2005) setting a maximum  $r^2$  threshold at 0.85 for all SNPs with minor allele frequency (MAF) of 0.15 or 0.25 for those genes with more than 20 tagSNPs (*SNAP25*, *SYT2*, *CPLX2*, *SNPH*). A total of 145 SNP (69 in multi-loci bins and 76 singletons) were chosen with these criteria. Three additional SNPs were included: rs2293485 in exon 3

of *STX1A*, rs1968583 in exon 2 of *SYT2* and rs2293945 in intron 6 of *SYP*. Incompatibilities in the SNPlex genotyping design forced the exclusion of 16 singleton SNPs that had been initially selected; besides, 11 redundant SNPs from multi-loci bins could be included to avoid information decay in case of genotyping failure. Finally, 143 SNPs were genotyped in three genotyping assays of 47 or 48 SNPs.

To detect population stratification, 48 unlinked SNPs located at least 100 kb distant from known genes were also genotyped (Sanchez et al., 2006). Genotyping was performed using the SNPlex platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the Barcelona node of the National Genotyping Center (CeGen) as described (Tobler et al., 2005). Two CEPH samples were included in all genotyping assays and a 100% concordance with HapMap data was obtained.

#### *Statistical analyses*

In order to identify potential susceptibility factors specific to MO or to MA and to reduce heterogeneity, the samples of these two clinical groups were examined separately. However, when a variant was found associated with both MO and MA after multiple testing corrections, the two data sets were studied together. Individuals presenting >40% of missing genotypes were excluded.

The analysis of minimal statistical power for the  $\chi^2$  test was performed *post hoc* using the Genetic Power Calculator software (Purcell et al., 2003), assuming an odds ratio (OR) of 1.5, a disease prevalence of 0.12, a significance level ( $\alpha$ ) of 0.05 and the lowest minimal allele frequency (MAF) value, 0.121, as calculated in our control sample, and showed statistical powers of 80% in the MO group, 72% in MA and 89% for the whole group.

Potential genetic stratification was tested by analyzing 45 SNPs (3 failed) in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) from the anonymous 48-SNPs set using three different approaches: the STRUCTURE software, Fst coefficient and the method by Pritchard and Rosenberg, as described (Ribases et al., 2009).

#### *Single-marker analysis*

Only genotyping data passing through the filter criteria were incorporated in the case-control analysis: SNPs with MAF >0.10, not in strong LD with other SNPs ( $r^2 < 0.85$ ), and in HWE ( $p > 0.01$ ) in our control population. The minimal SNP call rate was set at >85%. The analysis of HWE (threshold set at  $p < 0.01$ ) and the comparison of both genotype and allele frequencies between cases and controls were performed using the SNPassoc R library (Gonzalez et al., 2007). When an association was identified either under a codominant genotype model or in alleles comparison, dominant (11 vs 12+22)

and recessive (11+12 vs 22) models were further examined. All tests were adjusted for sex. For the X-linked genes we analyzed only females in the comparison of genotype frequencies and both males and females in allelic comparisons.

For the multiple comparison corrections, we considered all tests performed and assumed a false discovery rate (FDR) of 15%, which corresponds to a significant threshold of  $P < 0.00278$ , using the Q-value R Package (Storey 2002). The Bonferroni correction considering two clinical groups and the analysis of genotypes and alleles at the 98 SNPs that fulfilled the inclusion criteria, set the significance threshold at  $P < 1.27e-04$ .

### *Multiple-marker analysis*

The haplotype-based association study was restricted to those genes showing association in the single-marker analysis after the FDR and/or Bonferroni correction. The best haplotype, up to four markers, from all possible combinations was identified in the relevant group as previously described (Ribases et al., 2009) with the UNPHASED software (Dudbridge 2008) and significance was adjusted through a 10,000 permutations procedure. Specific individual haplotypes were estimated using the PHASE 2.1 software (Stephens et al., 2001) considering cases and control subjects separately. Risk haplotype carrier frequencies were compared between cases and controls adjusting by sex with the SNPassoc software.

Finally, to test potential differences between the two allele variants of exonic SNPs in their capability to bind putative exonic splicing enhancers, we used the the ESEfinder 3.0 software (Cartegni et al., 2003).

## **RESULTS**

After the exclusion of markers and individuals that did not fulfill the minimum established criteria, we studied 98 tagSNPs in 15 candidate genes encoding proteins involved in the process of vesicle fusion for neurotransmitter release in 538 patients, 312 with MO and 226 with MA, and 538 controls.

### *Analysis of single markers*

Population admixture was excluded in our sample using the STRUCTURE software (Supplementary table II), the  $F_{st}$  coefficient ( $\theta = 0$  with a 99% confidence interval (CI) of 0.000-0.001), and the Pritchard and Rosenberg method ( $p = 0.268$ ).

We analyzed the MO and MA groups in turn, to allow for the detection of possible specific susceptibility genes that might have gone otherwise unnoticed.

The comparison of the genotype and allele frequencies in the MO group found nominal association of 12 SNPs within 7 genes (*SNAP25*, *VAMP1*, *SYT1*, *SYT2*, *CPLX2*, *CPLX3* and *NSF*); the study of MA revealed differential distributions in 4 SNPs within 3 genes (*SYT2*, *CPLX2* and *NSF*). Data are summarized in Table 1. After correcting for multiple testing using FDR at 15%, which set the significant threshold at  $P < 0.00278$ , only rs6887620 and rs10072860 of the *CPLX2* gene in MO and rs183211 of *NSF* in MA remained significant. However, these associations did not withstand the restrictive correction of Bonferroni. As none of these genes showed evidence of association in both MO and MA after multiple testing corrections, the analysis of the whole migraine group was not performed.

#### *Analysis of multiple markers*

The haplotype-based association study was performed only in those genes showing evidence of single-marker association after the 15% FDR correction. Risk haplotypes were identified in the *CPLX2* and *NSF* genes and remained significant after applying a multiple comparison correction by permutation (see adjusted P-values in Table 2).

The analysis of all possible SNP combinations within the *CPLX2* gene identified an association between MO and a three-marker haplotype (rs17065535-rs6887620-rs10866692; global adjusted P-value=0.00069; Table 2), due to an over-representation of the G-G-G allelic combination in MO patients (OR=1.43, 95% CI=1.34-3.12) and an over-representation of C-A-C in controls (OR=1.69, 95%CI=1.22-2.34; Table 3). In this regard, G-G-G haplotype carriers showed a 4.3-fold risk of suffering MO when compared to non-carriers (95% CI=2.63-7.14;  $P=1.9 \times 10^{-9}$ ; data not shown).

The haplotype-based study of *NSF* variants revealed an association between MA and a two-marker haplotype (rs183211-rs17692129; global adjusted P-value=0.0022; Table 2). The G-C allelic combination was significantly more frequent in MA cases than in controls (OR=1.32, 95% CI= 1.06-1.66; Table 3), whereas the A-C haplotype was more frequent in controls (OR= 1.58, 95% CI= 1.22-2.04; Table 3). The haplotype carriers risk for MA was increased 1.95 fold (95% CI=1.22-3.11;  $P=0.0057$ ).

## **DISCUSSION**

We aimed to investigate the contribution to migraine susceptibility of 15 genes encoding proteins involved in the regulation of neurotransmitter release. As it is still an open debate whether MO and MA have a common etiology (Manzoni and Torelli, 2008;

## Resultats capítol 4.II

Russell 2008), and in order not to miss specific susceptibility factors, case-control association studies were initially performed in the MO and MA groups separately. Several nominal associations were identified in each group but only SNPs in *CPLX2* in the MO group and in *NSF* in the MA group remained significant after corrections for multiple testing. Risk haplotypes were identified in the *CPLX2* gene (for MO) and in the *NSF* gene (for MA), although in the latter the single-marker association displayed a higher OR.

### *CPLX2*

Complexins are, with synaptotagmins, crucial effector proteins contributing to the fine-tune regulation of neurotransmitter release. Complexins play both inhibitory and stimulatory roles in the membrane fusion process. First, complexins bind tightly to the SNARE complex in a stable conformation preventing vesicle fusion. Then,  $Ca^{2+}$  binds its sensor synaptotagmin, which also interacts with the SNARE complex, inducing structural rearrangements which lead to the opening of the fusion pore inducing a fast neurotransmitter release through the concerted action of all these proteins (Carr and Munson, 2007; Rizo and Rosenmund, 2008). Inactivation of *CPLX2* in *Drosophila* resulted in the blockage of regulated exocytosis and a dramatic increase of fusion of synaptic vesicles (Malsam et al., 2008). Subtle variations of this machinery could alter neurotransmission release enhancing a hyperexcitable state of the brain and thus predisposing to migraine.

There are no available data about any possible functional role for the SNPs that make up the MO-risk haplotype identified by us. The risk haplotype is composed of three SNPs: rs17065535 and rs6887620, located in intron 2, and rs10866692, in the 3'UTR region of exon 5. Interestingly, rs10866692 is in strong LD ( $r^2=0.97$ ) with another 3'-UTR variation, rs1560034, which putatively alters the binding of a splicing enhancer to its predicted ESE (Exonic Splicing Element) target. The score for the binding of the Srp40 SR protein was nearly duplicated (6.08 for the rs1560034C allele and 3.69 for T) and two new targets for SF2/ASC (scores around 3) trespassed the minimal threshold set at 1.9 for the C allele, whereas the T allele produced negative scores (ESEfinder). These data are potentially relevant and warrant genotyping of this SNP in our series of patients and controls and also in other populations to confirm its association to the MO phenotype. Subsequently, RNA studies may be performed to study the predicted role of this variant in splicing.

The preliminary SNP selection in *CPLX2* included 32 SNPs to capture the majority of the genetic variance of this 87-kb gene. We limited the number of SNPs to reduce costs without losing too much information by raising the MAF threshold from 0.15 to

0.25, leading to a final selection of 27 SNPs that were included in the SNPlex assay. As two SNPs were rejected due to technical constraints, five failed in genotyping and one was excluded because of high LD with another variant, only 19 SNPs were finally studied. As evidence of association was identified, further studies in less frequent variants, as well as those that could not be studied here are warranted.

### *NSF*

NSF plays an essential role in cell survival by dissociating and reactivating the proteins of the already 'used' SNARE complexes (Zhao et al., 2007). Particularly, neurotransmitter release and fast synaptic cycling have a high NSF demand (Malsam et al., 2008). Some mutations alter the NSF disassembling capacity by disrupting the ATP activity or by modulating its affinity to bind SNARE complex components or regulatory elements (Zhao et al., 2007). Furthermore, several studies point to additional roles out of vesicular transport for NSF, as the interaction with cell-surface signaling receptors, some of them previously associated to migraine as dopamine and GABA receptors (Colson et al., 2007; Russo et al., 2005; Zhao et al., 2007).

It is worth noting that the rat NSF homologue has been related to spontaneous recurrent seizures (Yu et al., 2002). Consideration of these data and the present association identified between *NSF* and MA are in accordance with the well known relationship between migraine and epilepsy. Several observations support this connection, such as the paroxysmal character of both disorders, the existence of comorbidity, the fact that some antiepileptic drugs are effective in migraine prophylaxis (Calabresi et al., 2007; Haut et al., 2006). Also, it has been postulated that both conditions may result from altered neuronal excitability with a similar genetic basis (Haut et al., 2006). Indeed, mutations in the *CACNA1A* gene, encoding the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1 subunit, are responsible for a variety of phenotypes in different families, including hemiplegic migraine and epilepsy (Pietrobon 2007). Further, up to three different mutations causing FHM have been detected in *SCN1A*, the gene responsible for most cases of severe myoclonic infantile epilepsy and generalized epilepsy with febrile seizures plus, among other epileptic disorders. Therefore, it would be of notable interest to evaluate the participation of *NSF* SNPs in epilepsy. Moreover, a recent study identified in patients suffering from Ohtahara syndrome, one of the most severe and earliest forms of epilepsy, one microdeletion and four heterozygous deletions in *STXBP1* (Saitou et al., 2008). Although we found no association with migraine, this gene is a good candidate to be evaluated in epilepsy.

The SNPs studied in the *NSF* gene were selected from the HapMap phase II database. These SNPs were located exclusively in the downstream region of the gene

between intron 13 and the 3' region. No SNP in the first 120 kb has been genotyped in the context of the HapMap project and consequently the LD patterns of this region are unknown. Recently, HapMap phase III has been released, but only 2 new SNPs in intron 1 and 8 have been included, although many others (most of them not yet validated) have been reported in dbSNP build 129 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/)). An insightful knowledge of LD patterns is necessary to ensure complete gene coverage.

The studied SNPs have been selected on the basis of genetic coverage criteria, so they may not have a functional role but rather be in LD with those markers directly involved in the genetic susceptibility to migraine. SNP rs183211 belongs to a multi-loci bin which includes more than 20 SNPs in strong LD ( $r^2 > 0.85$ ; Table Supplementay 1). These SNPs are mainly located in introns or in the 3' vicinity of the gene, except for one of them, rs199533 (NM\_006178.2: c.2106G>A), which is a synonymous SNP in exon 19 ( $r^2 = 0.901$  with respect to rs183211). ESEfinder predicts a disruption in the binding affinity of the SR protein SRp40 when the rs199438T allele (score 1.55, under the standard threshold set at 2.67) is present, as compared to the rs199438C allele (score 3.09). This variant is a more suitable candidate for being causative, although further functional studies are warranted.

### *STX1A*

The present work also aimed to replicate, in an enlarged sample, the nominal associations identified previously by us in the *STX1A* gene (Corominas et al., 2009). Patients and controls from the previous study were included in the present analysis. However, none of the comparable studied SNPs presented even a nominal association with the phenotype: rs941299 (in strong LD with rs941298,  $r^2 = 0.98$ )  $P = 0.42$  in MO and  $P = 0.14$  in MA, and rs4363087  $P = 0.30$  in MO and  $P = 0.70$  in MA. Although the sample was smaller in the original study (210 patients and 210 controls), significant values were obtained even when migraine was divided into MO and MA. In consequence, the fact that the present study was not able to reproduce the results, suggests that the original association may be the result of a type I error. Finally, SNP rs6951030 was not analyzed in the present analysis due to genotyping failure and haplotype analysis was therefore not performed. SNP rs3793243, studied here, was not included in the previous report (Supplementary Table 1).

### *Considerations on the case-control design*

Several issues arise from case-control association studies and some considerations may be taken into account when interpreting the results.

In order to reduce clinical heterogeneity, cases were included only when the diagnosis, performed by specialized neurologists, strictly fulfilled the ICHD-II criteria. Also, the MA and MO series were studied separately to enhance detection of specific susceptibility factors. Controls were carefully interviewed to discard those with personal or familiar history of migraine or frequent headaches, were matched by sex with patients and were from the same geographical areas and of Caucasian Spanish descent. To evaluate population stratification in the sample, a set of 48 SNPs located more than 100 Kb far from any known gene was genotyped and three different approaches demonstrated the absence of genetic substructures.

Another problem is the lack of genetic coverage in some regions due to the reduction in the number of SNPs from the initial selection (n=148), to the genotyping phase (n=132, 89%) and the final analysis (n=98, representing 112 genotyped SNPs, 76%). Design constraints, genotyping failure and also unexpectedly high LD between some SNPs have been the major causes of exclusion (Supplementary table 1). This is detrimental especially in genes that require a few number of SNPs to be covered, like *VAMP2*, which could not be eventually analyzed as its only tagSNP failed (Supplementary table 1). To ensure full genetic coverage, future works are needed.

The sample size provides enough statistical power to detect association between the phenotype and the selected SNPs in the present sample; however, to study genetic variants with very subtle effects or with low frequency in the population, larger samples are needed.

When multiple comparisons are performed in the same study, an adequate application of statistical corrections is extremely important to minimize type I errors. The Bonferroni correction may be too stringent as the different statistical tests are not completely independent, a major requirement for its implementation. For this reason, we have applied FDR and permutation methods.

In conclusion, our data point to the participation of the *CPLX2* and *NSF* genes in the susceptibility to MO and MA, respectively. However, replication studies in independent case-control sets and/or family trios are warranted to confirm the involvement of these genes in migraine.

## REFERENCES

Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21(2):263-5.



- Barszczewski M, Chua JJ, Stein A, Winter U, Heintzmann R, Zilly FE, Fasshauer D, Lang T, Jahn R. 2008. A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell* 19(3):776-84.
- Calabresi P, Galletti F, Rossi C, Sarchielli P, Cupini LM. 2007. Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 28(4):188-95.
- Carr CM, Munson M. 2007. Tag team action at the synapse. *EMBO Rep* 8(9):834-8.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. 2003. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31(13):3568-71.
- Colson NJ, Fernandez F, Lea RA, Griffiths LR. 2007. The search for migraine genes: an overview of current knowledge. *Cell Mol Life Sci* 64(3):331-44.
- Corominas R, Ribasés M, Cuenca-Leon E, Narberhaus B, Serra SA, del Toro M, Roig M, Fernández-Fernández JM, Macaya A, Cormand B. 2009. Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: a case-control association study in the Spanish population. *Sotmès a la revista Neurosci Lett*.
- Dudbridge F. 2008. Likelihood-based association analysis for nuclear families and unrelated subjects with missing genotype data. *Hum Hered* 66(2):87-98.
- 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.
- Hargreaves R. 2007. New migraine and pain research. *Headache* 47 Suppl 1:S26-43.
- Haut SR, Bigal ME, Lipton RB. 2006. Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine. *Lancet Neurol* 5(2):148-57.
- IHS. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1:9-160.
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65(18):2814-32.
- Manzoni GC, Torelli P. 2008. Migraine with and without aura: a single entity? *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S40-3.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215.
- Moskowitz MA. 2007. Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine: impact on pathophysiology and treatment. *Funct Neurol* 22(3):133-6.
- Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Farkkila M, Hamalainen E, Kaprio J, Kaunisto MA, Heath AC and others. 2008. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 17(21):3318-31.
- Pietrobon D. 2007. Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4(2):274-84.
- Pietrobon D, Striessnig J. 2003. Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4(5):386-98.
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC. 2003. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19(1):149-50.
- Ribasés M, Ramos-Quiroga JA, Hervas A, Bosch R, Bielsa A, Gastaminza X, Artigas J, Rodriguez-Ben S, Estivill X, Casas M and others. 2009. Exploration of 19 serotonergic candidate genes in adults and children with attention-deficit/hyperactivity disorder identifies association for 5HT2A, DDC and MAOB. *Mol Psychiatry* 14(1):71-85.
- Rizo J, Rosenmund C. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15(7):665-74.
- Russell MB. 2008. Is migraine a genetic illness? The various forms of migraine share a common genetic cause. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S52-4.
- Russo L, Mariotti P, Sangiorgi E, Giordano T, Ricci I, Lupi F, Chiera R, Guzzetta F, Neri G, Gurrieri F. 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):327-33.

- Saitou H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A and others. 2008. De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 40(6):782-8.
- Sanchez JJ, Phillips C, Borsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D and others. 2006. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27(9):1713-24.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978-89.
- Storey J. 2002. A direct approach to false discovery rates. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 64:479-498.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. 2005. The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11):1592-3.
- Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, Wang Y, Spoonde AY, Koehler RT and others. 2005. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech* 16(4):398-406.
- Ungar D, Hughson FM. 2003. SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:493-517.
- Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA. 2007. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol* 6(6):521-32.
- Yoon TY, Shin YK. 2008. Progress in understanding the neuronal SNARE function and its regulation. *Cell Mol Life Sci*.
- Yu F, Guan Z, Zhuo M, Sun L, Zou W, Zheng Z, Liu X. 2002. Further identification of NSF\* as an epilepsy related gene. *Brain Res Mol Brain Res* 99(2):141-4.
- Zhao C, Slevin JT, Whiteheart SW. 2007. Cellular functions of NSF: not just SNAPs and SNAREs. *FEBS Lett* 581(11):2140-9.

**Table 1.** Nominally significant results of the association study of 98 SNPs from 15 SNARE-related genes in 538 migraine patients (312 migraine without aura, 226 migraine with aura) and 538 controls.

Gene	SNP	Cases			Controls			Genotype 11 vs 12+22			Genotype 11+12 vs 22			Allele 2 vs allele 1		
		11	12	Sum	11	12	Sum	P value	OR (95% IC)	P value	OR (95% IC)	P value	OR (95% IC)	P value	OR (95% IC)	
<b>Migraine without aura</b>																
<i>SNAP25</i>	rs362564	102 (34.8)	145 (49.5)	46 (15.7)	293	157 (29.5)	263 (49.3)	113 (21.2)	533	NS	-	NS	-	1.25 (1.02-1.53)	0.0340	
<i>VAMP1</i>	rs2240867	189 (61.8)	98 (32.0)	19 (6.2)	306	326 (61.3)	191 (35.9)	15 (2.8)	532	0.0467	-	NS	2.29 (1.14-4.57)	0.0189	NS	
<i>SVT1</i>	rs1113425	190 (64.0)	89 (30.0)	18 (6.1)	297	296 (55.3)	209 (39.1)	30 (5.6)	535	0.030	1.43 <sup>*</sup> (1.06-1.92)	0.0154	-	NS	NS	
	rs2251214	194 (64.9)	85 (28.4)	20 (6.7)	299	300 (55.9)	199 (37.1)	38 (7.1)	537	0.031	1.44 <sup>*</sup> (1.08-1.96)	0.011	-	NS	1.30 (1.02-1.67)	
<i>SVT2</i>	rs12141884	141 (48.3)	132 (45.2)	19 (6.5)	292	233 (44.3)	227 (43.2)	66 (12.5)	526	0.0196	-	NS	2.04 <sup>*</sup> (1.20-3.45)	0.0052	1.26 (1.01-1.57)	
	rs6673562	121 (40.7)	139 (46.8)	37 (12.5)	297	251 (47.4)	228 (43.1)	50 (9.5)	529	NS	-	NS	-	NS	1.24 <sup>*</sup> (1.01-1.54)	
<i>CPLX2</i>	rs6887620	140 (49.3)	116 (40.8)	28 (9.9)	284	201 (38.4)	258 (49.3)	64 (12.2)	523	0.0104	1.56 <sup>*</sup> (1.18-2.13)	0.0025 <sup>*</sup>	-	NS	1.35 (1.09-1.68)	
	rs10072860	89 (30.6)	124 (42.6)	78 (26.8)	291	167 (31.5)	268 (50.6)	95 (17.9)	530	0.0079	-	NS	1.69 (1.20-2.38)	0.0028 <sup>*</sup>	NS	
	rs10866692	83 (29.9)	156 (56.1)	39 (14.0)	278	152 (29.3)	256 (49.4)	110 (21.2)	518	0.0312	-	NS	1.66 <sup>*</sup> (1.11-2.50)	0.0105	NS	
<i>CPLX3</i>	rs7162232	106 (36.9)	139 (48.4)	42 (14.6)	287	233 (44.4)	244 (46.5)	48 (9.1)	525	0.0234	1.36 (1.01-1.83)	0.0389	1.70 (1.09-2.65)	0.0193	1.33 <sup>*</sup> (1.07-1.64)	
<i>NSF</i>	rs183211	121 (40.1)	150 (49.7)	31 (10.3)	302	261 (48.8)	213 (39.8)	61 (11.4)	535	0.0199	1.43 (1.07-1.90)	0.0139	-	NS	NS	
	rs17698176	199 (68.9)	87 (30.1)	3 (1.0)	289	374 (73.2)	121 (23.7)	16 (3.1)	511	0.027	-	NS	-	NS	NS	
<b>Migraine with aura</b>																
<i>SVT2</i>	rs10733069	61 (29.8)	102 (49.8)	42 (20.5)	205	196 (38.1)	239 (46.4)	80 (15.5)	515	NS	1.46 (1.03-2.07)	0.031	-	NS	1.32 <sup>*</sup> (1.05-1.67)	
<i>CPLX2</i>	rs4868538	118 (55.1)	90 (42.1)	6 (2.8)	214	304 (57.1)	190 (35.7)	38 (7.1)	532	0.0254	-	NS	2.63 (1.11-6.25)	0.0149	NS	
	rs10866692	69 (34.3)	103 (51.2)	29 (14.4)	201	152 (29.3)	256 (49.4)	110 (21.2)	518	NS	-	NS	1.58 (1.02-2.50)	0.0347	1.27 (1.01-1.61)	
<i>NSF</i>	rs183211	131 (59.3)	81 (36.7)	9 (4.1)	221	261 (48.8)	213 (39.8)	61 (11.4)	535	7.7e-4 <sup>*</sup>	1.54 <sup>*</sup> (1.11-2.08)	0.0082	3.03 <sup>*</sup> (1.49-6.25)	6.6e-4 <sup>*</sup>	1.58 (1.22-2.05)	

<sup>\*</sup> When odds ratio <1, the inverted score is shown.

<sup>\*</sup> Significant after FDR 15%

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism

**Table 2.** Haplotype analysis of *CPLX2* and *NSF* SNPs in 312 migraine without aura or 226 migraine with aura patients and control subjects using the UNPHASED software.

<i>Gene</i>	Pheno type	Marker <sup>a</sup> Haplotype	Global <i>P</i> (adjusted <i>P</i> )	Best Haplotype- <i>P</i> (adjusted <i>p</i> )	Risk Haplotype OR (CI)
<b><i>CLPX2</i></b>	MO	8 17	0.00878 (0.0091)	0.00244 (0.0095)	1.29 (1.04-1.61)
		6 8 17 <sup>b</sup>	0.000627 (0.00069)	0.00504 (0.0051)	2.05 (1.34-3.12)
		6 8 14 17	0.00102 (0.0011)	0.00429 (0.038)	1.98 (1.28-3.06)
<b><i>NSF</i></b>	MA	1 2 <sup>b</sup>	0.00163 (0.0022)	0.00051 (0.0023)	1.32 (1.06-1.66)
		1 2 3	0.00293 (0.0041)	0.00066 (0.0034)	1.28 (1.01-1.61)

<sup>a</sup> ***CPLX2***: 6-rs17065535; 8-rs6887620; 14-rs4868539; 17-rs10866692; ***NSF***: 1-rs183211; 2-rs17692129; 3-rs17698176

<sup>b</sup> Best allelic combination (higher OR)

MO: migraine without aura, MA: migraine with aura, CI: confidence interval

**Table 3.** Haplotype distributions of *CPLX2* in 312 migraine without aura patients and of *NSF* in 226 migraine with aura patients, and 538 controls.

<i>Gene</i>	Phenotype	Marker <sup>a</sup> Haplotype	Cases	Controls	Haplotype-specific <i>P</i> ; OR (CI)
<b><i>CLPX2</i></b>	MO	<b>6 8 17</b>			
		C A C	55 (11.1)	168 (17.6)	0.000803; 1.69 (1.22-2.34) <sup>b</sup>
		C G C	139 (28.3)	221 (23.2)	-
		C G G	151 (30.8)	290 (30.4)	-
		G A G	81 (16.5)	162 (17.0)	-
		G G C	18 (3.7)	66 (6.9)	-
		G G G	47 (9.6)	47 (4.9)	0.00504; 2.05 (1.34-3.12)
<b><i>NSF</i></b>	MA	<b>1 2</b>			
		A C	99 (22.5)	335 (31.4)	0.000505; 1.58 (1.22-2.04) <sup>b</sup>
		G C	211 (47.9)	438 (41.1)	0.0144; 1.32 (1.06-1.66)
		G T	130 (29.6)	293 (27.5)	-

<sup>a</sup> ***CPLX2***: 6-rs17065535; 8-rs6887620; 17-rs10866692; ***NSF***: 1-rs183211; 2-rs17692129;

<sup>b</sup> Down-represented in MA patients in comparison with control subjects

MO: migraine without aura, MA: migraine with aura, CI: confidence interval

**Supplementary table 1.** Description of the SNPlex assay within 15 candidate genes encoding proteins involved in vesicle fusion for neurotransmitters release (data from HapMap Phase II\_April07\_dbSNP126\_NCBI B36).

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage #	Other SNPs within the bin	
<b>SNAP25</b>	NM_003081	20p12.2	88.59	8	40	19	rs1889189	5'	-	0.90	-	
							rs6039769	5'	No SNPlex	-	-	
							rs363039	Intron 1	-	-	-	
							rs363043	Intron 1	rs6077699, rs6514092	-	-	
							rs12626080	Intron 1	rs363016, rs6039792, rs6104571	-	-	
							rs6074113	Intron 1	rs363021	-	-	
							rs362564	Intron 1	LD <sup>§</sup>	rs363022	-	-
							rs362547	Intron 1	rs362569, rs362548, rs363018, rs362562, rs6039795	-	-	
							rs362569 *	Intron 1	rs362547, rs362548, rs363018, rs362562, rs6039795	-	-	
							rs362570	Intron 1	-	-	-	
							rs6039806 *	Intron 6	rs6039807, rs6108461, rs362549, rs362987	-	-	
							rs6039807	Intron 3	LD <sup>§</sup>	rs6039806, rs6108461, rs362549, rs362987	-	-
							rs3025873	Intron 4	Failed	-	-	
							rs362988	Intron 7	rs6039820	-	-	
							rs6108464	Intron 7	-	-	-	
rs3787283	Intron 7	-	-	-								
rs4813925	Intron 7	rs8636	-	-								
rs6074121	3'	-	-	-								
rs4813927	3'	rs6032845	-	-								
rs3025879	3'	rs362599, rs362600	-	-								
rs6032846	3'	-	-	-								
<b>STX1A</b>	NM_004603	7q11.23	20.45	10	8	4	rs6951030	Intron 1	Failed	0.75	-	
							rs941298	Intron 1	LD <sup>§</sup>	rs4717806, rs867500, rs941299	-	-
							rs941299 *	Intron 1	rs941298, rs4717806, rs867500	-	-	
							rs2293485	Exon 3	No SNPlex	-	-	
							rs3793243	Intron 3	-	-	-	
							rs4363087	Intron 6	rs1001220	-	-	

<b>VAMP2</b>	NM_014232	17p13.1	3.83	5	4	1	rs8067606	5'	Failed	0	rs2278637, rs1150, rs9899533		
	<b>VAMP1</b>	NM_014231	12q13.31	8.4	5	33	8	rs2534724	5'	0.63	rs2534722, rs10849466, rs2532485, rs7390, rs1045452, rs2534712, rs1045548		
		rs2072377	5'	Failed									
		rs2072376	Exon1 5'UTR	No SNplex									
		rs2240867	Intron 7										
rs11064210	Intron 1					rs10849462, rs12422771, rs10492096, rs1045546, rs12426815							
rs2534715, rs1034969, rs1017101, rs2240866, rs2058288, rs2072375, rs2534713, rs2243750, rs2243977, rs2244083, rs2534721	Intron 4												
rs12964	Exon 5	Failed											
rs2534711	3'	LD <sup>s</sup>											
<b>SYT1</b>	NM_005639	12q21.2	233.6	8	132	14	rs7979581*	5'	Failed	1.0	rs2177963, rs10861698, rs1918193, rs2037743, rs1918195, rs7968716, rs1918188, rs1918190, rs7311549, rs8181778, rs7967265, rs1918191, rs4842447, rs10861717, rs1405498, rs1465054, rs1358248, rs6539317, rs1245803, rs1245804, rs1245806, rs1245810, rs1245814, rs1245819, rs1245820, rs1268463, rs1245824, rs1312846, rs1245825, rs1245828, rs1245835, rs1245837, rs1245840, rs1245841, rs1245842, rs10778564, rs10778565, rs10861753, rs10861755, rs10861757, rs2141701, rs1921026, rs10861758, rs10861799, rs6539315, rs1245807, rs1245831, rs1245832, rs10861769, rs2293650, rs11113673, rs1465053, rs1245805, rs12578266, rs7296233, rs10746105, rs11609774, rs10746106, rs10746114, rs7967411		
							rs2177963	Intron 1	LD <sup>s</sup>				
							rs6539344	Intron 1					rs1245829, rs7963801
							rs11113410*	Intron 1					rs2400393, rs10861762, rs11113435, rs10778573, rs10778575, rs7300645, rs2272500, rs10861795, rs10861796, rs10861797, rs6539373, rs4612885, rs1526952, rs10746103
							rs11113425	Intron 1					
							rs2400393	Intron 1	LD <sup>s</sup>				rs11113410, rs10861762, rs11113435, rs10778573, rs10778575, rs7300645, rs2272500, rs10861795, rs10861796, rs10861797, rs6539373, rs4612885, rs1526952, rs10746103
							rs1732664	Intron 6					
							rs10861941	Intron 6					
							rs1245775	Intron 6					

		NM_177402		1q32.1	114.7	9	85	23		
<b>SYT2</b>										
rs6539445	Intron 6									rs11113980
rs1245778	Intron 6	LD <sup>§</sup>								rs1245765, rs7308297, rs1465051, rs2400395, rs9788036, rs7966962, rs1245769, rs1245766, rs10861976, rs10778657, rs10861975, rs1465044
rs11114027	Intron 6									-
rs1245767	Intron 6	LD <sup>§</sup>								-
rs1245765 *	Intron 6									rs1245778, rs7308297, rs1465051, rs2400395, rs9788036, rs7966962, rs1245769, rs1245766, rs10861976, rs10778657, rs10861975, rs1465044
rs17005544 *	Intron 6									rs1465046, rs12581451, rs10506815, rs11405493, rs11608808, rs7303658, rs1465048, rs1465049, rs1405495, rs1526955, rs17005561, rs1358243, rs1405497, rs7315638, rs7295888, rs17005561, rs1358243, rs1405497, rs7315638, rs7295888, rs17005588, rs11612225, rs2701566
rs1465046	Intron 6	LD <sup>§</sup>								rs17005544, rs12581451, rs10506815, rs1405493, rs11608808, rs7303658, rs1465048, rs1465049, rs1405495, rs1526955, rs17005561, rs1358243, rs1405497, rs7315638, rs7295888, rs17005588, rs11612225, rs2701566
rs17294719	Intron 6									rs7954927, rs1526963, rs17005594, rs11833031, rs11114107, rs7135647, rs11114122, rs7315113, rs11114116
rs2251214	Intron 6									-
rs10800856	5'						0.61			-
rs12564274	5'	Failed								-
rs12409197	Intron 1									rs3923371, rs4325195
rs12141884	Intron 1									-
rs4364933	Intron 1	LD <sup>§</sup>								-
rs4400672	Intron 1									rs4072140, rs10920457, rs11590011, rs11588808, rs4950738, rs4950788, rs4362037, rs11578029, rs12040487, rs12046408
rs10920459	Intron 1									rs4418670, rs4572021
rs4072140 *	Intron 1	Failed								rs4400672, rs10920457, rs11590011, rs11588808, rs4950738, rs4950788, rs4362037, rs11578029, rs12040487, rs12046408
rs6673562	Intron 1									rs6698441, rs11585345, rs6693751, rs4453099
rs10800855	Intron 1	Failed								rs4950786, rs4950865, rs4113203, rs6661284, rs6662116, rs10920451, rs10920452, rs4950866, rs4950867, rs2095981, rs12038816, rs6696612, rs4372314, rs16850204
rs4950786 *	Intron 1									rs10800855, rs4950865, rs4113203, rs6661284, rs6662116, rs10920451, rs10920452, rs4950866, rs4950867, rs2095981, rs12038816, rs6696612, rs4372314, rs16850204
rs7550433	Intron 1	Failed								rs867316, rs12047572, rs10920440, rs10920445, rs6669326, rs1417160, rs7517181, rs4950785, rs12728991, rs10800847
rs10733069	Intron 1									rs867313, rs867314, rs946857, rs12404969, rs10920442, rs4950863, rs4537626, rs10737582
rs867316 *	Intron 1									rs7550433, rs12047572, rs10920440, rs10920445, rs6669326, rs1417160, rs7517181, rs4950785, rs12728991, rs10800847





rs6874025	Intron 2	rs17065511, rs883188
rs12520557	Intron 2	rs2382123, rs688724, rs10475623
rs11134932	Intron 2	Failed
rs4242187	Intron 2	-
rs10476170	Intron 2	-
rs17065535	Intron 2	-
rs6556225	Intron 2	-
rs6887620	Intron 2	rs1560035
rs10072860	Intron 2	-
rs12188152	Intron 2	No SNplex
rs4867806	Intron 2	rs4868537, rs1560036
rs11134935	Intron 2	-
rs4868538	Intron 2	rs10866690
rs4867807	Intron 2	LD <sup>s</sup>
rs10866691	Intron 2	rs10076867, rs999065
rs4868539	Intron 2	-
rs871853	Intron 2	rs11134938, rs6860661, rs871853, rs1560033, rs4867808, rs3892909, rs4077871, rs3180249, rs12656972
rs890737	Intron 2	rs7705543, rs1820646, rs1366116, rs12522368
rs1006101	Exon 5 3'UTR	Failed
rs10866692	Exon 5 3'UTR	rs4867809, rs9313730, rs3822674
rs930047	Exon 5 3'UTR	No SNplex
rs13166213	3'	Failed
rs11134942	3'	-
rs2382114	3'	rs2114968, rs7718100
rs7162232	5'	0.50
rs6495122	3'	No SNplex
rs609209	Intron 1	No HWE
rs10503024	Intron 2	-
rs509886	Intron 2	rs561894, rs668992, rs654802
rs640401	Intron 2	rs537048, rs536113, rs508858
rs12232757	Intron 2	rs4940456
rs12456930	Intron 2	-
<b>CPLX3</b>		
NM_001030005	15q24.1	5.19
		3
		4
		2
<b>CPLX4</b>		
NM_181654	18q21.32	23.23
		3
		27
		9

<b>NSF</b>	NM_006178	17q21.32	166.6	21	4	rs7228681	Intron 2	Failed	rs4940455, rs10871768, rs7243416, rs12232751, rs599535, rs563241, rs11662475, rs1980176, rs4108696
						rs499824	Exo 3 3'UTR		rs606952
						rs1914321	Exo 3 3'UTR	Failed	rs17696543
						rs183211 *	Intron 13	0.75	rs199538, rs199536, rs199438, rs142167, rs199455, rs199454, rs199452, rs199449, rs199442, rs199536, rs199530, rs199529, rs199439, rs199456, rs199448, rs199445, rs199535, rs199534, rs199533, rs538628, rs199443
rs199438	Intron 15	LD <sup>\$</sup>		rs199536, rs183211, rs199438, rs142167, rs199455, rs199454, rs199452, rs199449, rs199442, rs199536, rs199530, rs199529, rs199439, rs199456, rs199448, rs199445, rs199535, rs199534, rs199533, rs538628, rs199443					
rs17692129	Intron 15	-		-					
rs7224296	Intron 15	Failed							
rs17698176	Intron 17	-							
rs3786521	Intron 1	Failed	0.50						
rs830146	Intron 1	-							
<b>STXBP1</b>	NM_003165	9q34.11	80.43	19	8	rs2039204	5'	LD <sup>\$</sup>	rs1573178
						rs7852204	5'		rs4837172, rs10819303, rs3824523, rs4836575
						rs2241167	Intron 9	No SNPlex	-
<b>SNPH</b>	NM_014723	20p13	43.01	6	22	rs11905792	Intron 2	0.83	-
						rs6109320	Intron 3	-	
						rs2317645	Intron 4	rs3795141 rs3818331	
						rs912105	Intron 4	-	
						rs7354385	Intron 5	rs6033370, rs6078505	
						rs3764715	Exon 6 3'UTR	rs966846, rs912108	
						rs6134520	Exon 6 3'UTR	Failed	rs11449
						rs3803947	Exon 6 3'UTR	Failed	-
						rs7466	3'	LD <sup>\$</sup>	-
						rs4814106	3'	-	
rs1048621	3'	Monomorphic	-						
rs2281711	3'	rs2273959, rs2273958, rs3795137							
rs5906754	5'	1.0							
rs2293945	Intron 6	-							
<b>SYP</b>	NM_003179	Xp11.23	12.4	7	1	1			

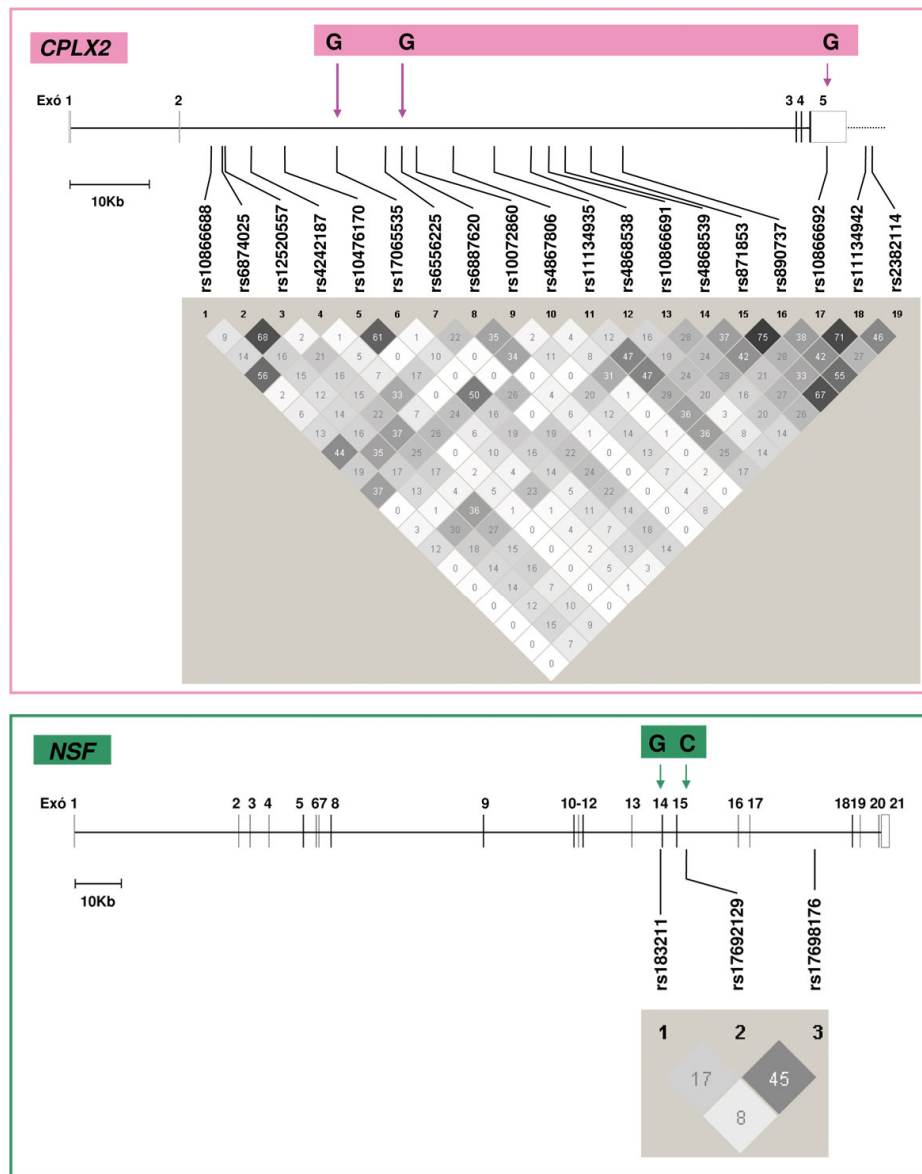
\* SNPs in LD >0.85 with other SNPs within the gene, redundant information; \$ LD with other SNPs within the gene in the sample of 528 controls; # Analyzed non redundant tagSNPs/total tagSNPs within the gene; LD Linkage Disequilibrium; HWE Hardy-Weinberg equilibrium



## ANNEX CAPÍTOL 4. Neurosecreció sinàptica (II)

### 4.3 Resultats complementaris

La figura 16 mostra un esquema dels gens *CPLX2* i *NSF* que presenten associació a diverses formes de migranya amb la localització dels SNPs i els haplotips de risc identificats, així com l'esquema dels patrons de disequilibri de lligament a la nostra població control control.



**Figura 16.** Esquema del gens *CPLX2* i *NSF* i localització dels SNPs que formen part dels haplotips de risc identificats. Sota l'esquema dels gens, els patrons de disequilibri de lligament ( $r^2$ ) establerts amb el programa Haploview a partir de la nostra població control control. Els valors de  $r^2$  més elevats s'indiquen en negre, i els més baixos en blanc (RefSeq *CPLX2*:NM\_006650; RefSeq *NSF*: NM\_006178, respectivament)

