

TESI DOCTORAL

“GENÈTICA I EPIGÈNETICA DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS”

MEMÒRIA PRESENTADA PER
Marta Vila Pueyo

PER OPTAR AL GRAU DE
Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

PROGRAMA EN NEUROCIÈNCIES
INSITUT DE NEUROCIÈNCIES
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
2011-2014

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del **Dr. Alfons Macaya Ruiz** i la **Dra. Patricia Pozo Rosich** i sota la tutorització del **Dr. Jesús Giraldo Arjonilla**, al Grup de Recerca de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron, gràcies a la beca predoctoral atorgada per l'Institut de Recerca de la Vall d'Hebron.

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Dra. Patricia Pozo Rosich

Dr. Jesús Giraldo Arjonilla

MARTA VILA PUEYO
2014



AGRAÏMENTS

Des que he començat amb l'escriptura d'aquesta tesi que em neguiteja haver d'escriure els agraïments. Probablement perquè m'havia proposat deixar aquest apartat pel final i, com tots els finals, suposa una barreja d'emocions tant positives com nostàlgiques. Acabar una etapa quan ha estat un període feliç, productiu i ple d'aprenentatge, em desperta un punt de tristesa. Alhora, però, acabar una etapa suposa començar-ne una de nova. L'arribada de nous reptes, fer un pas endavant, sortir de la zona de comoditat, trepitjar nous laboratoris... Tot això també em neguiteja, però és el que necessito per a seguir endavant en la meua carrera científica.

Tal i com vaig llegir als agraïments de la tesi del Tomàs Pinós, una tesi reflexa la feina conjunta de molta gent. Des del propi doctorand, els directors, els postdocs, els altres doctorands, els estudiants... Tots els investigadors que han estat al teu voltant hi han aportat una part important que, en el meu cas, ha estat imprescindible per avançar en la meua tesi. Per això espero poder plasmar en aquestes línies el paper que ha tingut tothom en aquests darrers quatre anys.

Per començar voldria agrair a l'Alfons Macaya per haver-me donat l'oportunitat de començar la meua carrera científica i dur a terme la tesi en el seu grup de recerca. L'Alfons m'ha donat un espai, una responsabilitat i una independència que considero que m'han fet créixer no només com a científica, sinó també com a persona. L'Alfons és neuròleg pediatria i investigador amb interès per un gran ventall de malalties; però també és moltes altres coses. Tot i que la clínica i la burocràcia cada vegada li cedeixen menys temps per a dedicar-se a la recerca, el seu interès per a estar al dia en tots els temes (que no són pocs!) que es toquen al seu grup de recerca és increïble.

Qui em va introduir en el món de la migranya va ser la Patricia Pozo. Crec que amb els anys he pogut convèncer-la del meu interès en treballar en els seus projectes, tot i que al principi es pensés que marxaria cap a una altra banda. Amb la Patricia hem compartit hores d'estabulari, congressos, xerrades... M'ha ajudat a posar el primer peu en la meua carrera internacional, gràcies als seus nombrosos contactes arreu. Vull agrair-li moltes coses, però sobretot remarcar que m'ha ajudat a seguir endavant en molts moments.

L'Ester Cuenca ha estat una persona molt important en període. Tot i que marxés del laboratori deixant-me orfe de post-doc, estigués on estigués m'ha donat un cop de mà quan l'he necessitada. Ella em va ensenyar tot el que sabia perquè pogués desenvolupar-me a la poiat sense problemes.

També vaig passar molts bons moments amb l'Aintzane, la Solange i la Marta Rebull. Amb l'Aintzane vam compartir els meus primers i els seus darrers anys de tesi, cosa que no és fàcil! La Solange té una increïble facilitat per fer que les coses semblin sempre tant fàcils... "Un xurrito d'això, un xurrito d'allò..." La Marta ha estat la meua "súper tècnic", tenia resposta per a tot!

També vull agrair a la Francina la seva ajuda. Les seves aportacions i crítiques m'han servit més del que potser n'és conscient. També m'ha ajudat a donar més importància a les dones científiques, ara em miro els descobridors del DNA amb uns altres ulls!

Amb la Jessy vaig començar a Vall d'Hebron en la meua etapa pre-tesi. La seva energia és desbordant! Tot i no haver compartit molt temps juntes, gràcies a ella li tinc un carinyo especial a la migranya.

La Sílvia, l'Anna i la Mari m'han aguantat en els meus últims mesos. Us prometo que no sempre he estat tant "abuela"! Gràcies per fer que aquests mesos d'ordinador pur i dur no acabessin amb la meua integritat mental...He pogut compartir moments amb molts estudiants que han passat pel laboratori: la Íngrid, el Toni, la Sola, el Marc, la Bárbara, l'Andrea, la Míriam. De tots n'he pogut aprendre coses i tots han aguantat heroicament els meus rollos de "profe" que tant m'agraden!

Però els que no han compartit laboratori amb mi han estat tant o més importants que els que sí que ho han fet. La Cris i la Marta són les meves postdocs adoptives, però sobretot les meves amigues. M'han ajudat en tots els aspectes, tant científics com personals. Han aguantat de tot! No sabia com agrair tot el que han fet per mi...Però no s'acaba aquí. L'Àlex ens va revolucionar des del primer dia. Ens ha ensenyat que si vols fer una cosa, la fas i punt. Encara que t'hagis d'estar més de 12 hores al lab per aconseguir-ho... També em quedaria curta intentant agrair tot el que ha fet per mi. Igual que la Paola, que va arribar un xic més tard, però això no implica que hagi estat menys important. M'ha acollit d'una manera increïble, hem compartit moments de laboratori, bogeries de l'ex-omaquesisón els pares o no o què està passant?, favades, cerveses... Encara recordo el dia que va venir a fer l'entrevista amb la Francina, jo acabava d'operar una rata i feia una pinta...La Iris va ser la meua primera estudiant. Sempre en fem broma d'això. Recordo el dia que vam aconseguir amplificar els exons del gen *ATP1A2*, vam fer un crit que fins i tot la Francina se'n va assabentar! Hem compartit milers de moments. M'ha ensenyat moltes coses i m'ha ajudat a millorar moltíssim com a profe de lab. El Mario sempre està allà per ajudar-te. Per què, si no, té tants amics a tot arreu? Igual que el David, li acabes agafant carinyo a la seva forma de ser. Crec que no conec a ningú tant pràctic com ell!

Volia agrair també l'ajuda als de la UB. El Bru m'ha ajudat en moments en què necessitava un genetista. Em sap greu no haver passat més temps amb l'Oriel, la Noe, la Cèlia i la Bàrbara. Sempre que he anat al seu lab m'han adoptat com una més i què dir dels dies a casa la Noe... Gràcies per tot!!!

Però a part de la meua “família científica”, també vull agrair tot el suport de la meua “família genètica”. Els meus pares i els meus germans m’han recolzat sempre en les meues decisions i m’han ajudat a no enfonsar-me en els moments més durs, com per exemple quan aplicava per les beques predoctorals. El Joan i la Conxi són químics, així que quan la filla els hi diu que vol ser biòloga... “ehem ehem, estàs segura filla?” Sabien que no seria un camí laboral fàcil, però sempre m’animen a seguir endavant. A més a més, ells m’han donat aquest raonament científic; serà cosa de la genètica o de l’epigenètica? El Xavi i l’Anna m’han recolzat sempre, donant-me una empenta, animant-me... sempre han estat aquí quan els he necessitat.

L’Àlex m’ha donat una gran empenta en l’última part de la meua tesi, la que considero més difícil. Ell m’ha ajudat a posar tota l’energia en aconseguir el que vull i m’ha ajudat a creure més en mi. N’he après molt de la seva manera de donar-li voltes a les coses, segurament la discussió d’aquesta tesi en té una part molt important d’això. També vull agrair a la seva família la increïble acollida que m’han fet.

La resta dels Vila i els Pueyo sempre m’ha recolzat moltíssim. La Pepi no ho veia clar quan buscava beques, “Marta, estudia i fes el BIR! Així et podràs quedar a l’hospital!”. L’avi Vila em va dir que havia de fer medicina, res de biologia! L’Euse, la Concha, la Madrona, el Jorge, l’Eli, el Manel, la Sus, l’Esther, el Ramon, el Sergi, l’Albert, el Sergi, la Maria, la Paula, l’Adriana, el Gerard, el Pablo, la Pepi, l’Albert, la Montse, el Fede, l’Anna, l’Àlex, el Jordi, la Sandra, el Joan, la Marta, el Pep, la Marta el Fede, la Roser, la Maitona... quina bona colla! Tots s’han interessat per mi i m’han ajudat en un moment o altre.

També volia remarcar el recolzament de l’Eric Vente. Ens va acollir a casa seva com si fóssim de la família i vam tenir xerrades interessantíssimes amb ell, la Karin i el Daniel.

Finalment vull agrair a l’Aubi, la Clara, el Portales, el Pere, l’Édgar, la Bárbara, l’Helena, el Joan, el Lucci, la Maialen, la Sara, el Nam, la Laia, l’Armando, l’Ivan, la Coline, el Ramos, l’Àngel, la Isela, el Roca, el Toni, el Tomàs, la Sílvia, el Roger, la Laura, l’Elena, la Laura, la Maria, el Marcel, el Bernat, la Maria, el Marcel, la Belén, l’Ori, la Kate, el Gerard, la Miri, la Maria, les Annes, la Cris... tot el seu recolzament i el seu carinyo. Què és una científica sense els seus amics? Surts del laboratori i les bandes de la PCR no han sortit o no hi ha hagut manera de registrar una CSD... “Algú vol fer una birra?” Després d’això, ho veus tot amb uns altres ulls i a l’endemà t’ho agafes amb més ganes!

ÍNDEX

ÍNDEX DE TAULES	12
ÍNDEX DE FIGURES	13
ABREVIATURES	15
INTRODUCCIÓ	17
1. TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS PEDIÀTRICS	19
a. Torticoli paroxístic benigne del lactant	20
b. Hemiplegia alternant de la infància	21
c. Discinèsia paroxística cinesigènica	22
d. Síndrome de la deficiència del transportador de glucosa <i>GLUT1</i>	22
2. TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS DE L'ADULT: LA MIGRANYA	23
a. Característiques generals	23
b. Diagnòstic	23
i. La migranya sense aura	25
ii. La migranya amb aura	25
iii. La migranya hemiplègica	26
c. Comorbiditat	27
d. Epidemiologia	28
e. Impacte socioeconòmic	29
f. Fisiopatologia	29
i. La crisi de migranya	29
ii. Les teories vascular, neuronal i neurovascular de la migranya	30
iii. La depressió cortical propagant i l'aura	31
iv. El sistema trigeminovascular	33
v. Desencadenants i moduladors de la depressió cortical propagant	34
vi. Models animals de migranya	35
g. Tractament	37
i. Tractament agut	37
ii. Tractament preventiu	37

3. GENÈTICA DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS	40
a. Les malalties monogèniques i les malalties genètiques complexes	40
b. Tècniques per a l'estudi genètic de les malalties monogèniques	40
i. Estudis de lligament en famílies	41
ii. Seqüenciació de gens candidats	41
iii. Seqüenciació de l'exoma	41
c. Tècniques per a l'estudi genètic de les malalties genètiques complexes	41
i. Estudis de lligament en famílies	42
ii. Seqüenciació de gens candidats	42
iii. Estudis d'associació en gens candidats	43
iv. Estudis d'associació a nivell genòmic	43
v. <i>Exome chip</i> : estudis d'associació usant variants rares i funcionals	43
d. Estudis genètics dels trastorns neurològics paroxístics pediàtrics	44
i. Torticolí paroxístic benigne del lactant	44
ii. Hemiplegia alternant de la infància	44
iii. Discinèsia paroxística cinesigènica	45
iv. Síndrome de la deficiència del transportador de glucosa <i>GLUT1</i>	45
e. Estudis genètics de les formes monogèniques de migranya: la migranya hemiplègica	46
i. La migranya hemiplègica i el gen <i>CACNA1A</i>	47
ii. La migranya hemiplègica i el gen <i>ATP1A2</i>	47
iii. La migranya hemiplègica i el gen <i>SCN1A</i>	47
iv. La migranya hemiplègica i el gen <i>PRRT2</i>	48
f. Estudis genètics de les formes comunes de migranya	48
i. Heretabilitat de la migranya	48
ii. Estudis de lligament genètic en famílies	48
iii. Seqüenciació de gens candidats	49
iv. Estudis d'associació a gens candidats	50
v. Estudis d'associació a nivell genòmic	51

4.	EPIGENÈTICA DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS	52
a.	Epigenètica: conceptes clau	52
b.	Modificacions epigenètiques	52
i.	Metilació de l'ADN	52
ii.	Modificació de les histones	54
iii.	Remodelació dels nucleosomes	54
iv.	Acció dels ARNs no codificants	55
c.	Estudis de metilació de l'ADN en gens candidats	55
i.	Bisulfitació de l'ADN	55
ii.	PCR específica de metilació	56
iii.	Piroseqüenciació de l'ADN bisulfitat	56
d.	Estudis de metilació de l'ADN a nivell genòmic	57
i.	Digestió enzimàtica mitjançant endonucleases	57
ii.	Enriquiment per afinitat a la metilació	57
iii.	Bisulfitació de l'ADN	58
e.	L'epigenètica i els trastorns neurològics paroxístics	58
f.	L'epigenètica i la migranya	59
	OBJECTIUS	61
	RESULTATS	63
1.	SEQÜENCIACIÓ DE GENS CANDIDATS EN TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS PEDIÀTRICS	65
a.	Article 1	65
	UNA MUTACIÓ DE PÈRDUA DE FUNCIÓ EN EL GEN <i>CACNA1A</i> CAUSA TORTICOLI PAROXÍSTIC BENIGNE DEL LACTANT	
b.	Article 2	71
	ANÀLISI CLÍNICA I GENÈTICA DE L'HEMIPLEGIA ALTERNANT DE LA INFÀNCIA EN 10 PACIENTS DEL SUD D'EUROPA	
c.	Annex 1	78
	SEQÜENCIACIÓ DEL GEN <i>PRRT2</i> EN LA DISCINÈSIA PAROXÍSTICA CINESIGÈNICA	

d.	Annex 2	82
	SEQÜENCIACIÓ I ESTUDI DE VARIACIONS EN EL NÚMERO DE CÒPIES DEL GEN <i>SLC2A1</i> EN LA SÍNDROME DE LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1	
e.	Annex 3	86
	CRIBRATGE GENÈTIC DELS GENS <i>CACNA1A</i> I <i>ATP1A2</i> EN LA MIGRANYA HEMIPLEGICA: ESTUDIS CLÍNICS, GENÈTICS I FUNCIONALS	
f.	Annex 4	104
	SEQÜENCIACIÓ DEL GEN <i>SCN1A</i> EN MIGRANYA HEMIPLEGICA	
2.	SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA EN FORMES MONOGÈNIQUES DE MIGRANYA	106
	Annex 5	106
	SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA EN MIGRANYA HEMIPLEGICA	
3.	ESTUDIS GENÈTICS EN MIGRANYA	113
	Annex 6	113
	UN ESTUDI D'ASSOCIACIÓ A NIVELL GENÒMIC IDENTIFICA UN LOCI DE SUSCEPTIBILITAT A LA MIGRANYA SENSE AURA	
4.	ESTUDIS EPIGENÈTICS EN MIGRANYA	122
	Annex 7	122
	ESTUDI DE METILACIÓ DE L'ADN EN UN MODEL DE DCP	
DISCUSSIÓ		143
1.	SEQÜENCIACIÓ DE GENS CANDIDATS EN TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS	143
	a. La cerca de nous gens: quin n'és l'objectiu?	143
	b. Mutacions o polimorfismes? Perjudicials o neutres?	143
	c. El gen <i>CACNA1A</i> : un sol gen i una gran variabilitat de fenotips	144
	i. El gen <i>CACNA1A</i> i la migranya hemiplègica	144
	ii. El gen <i>CACNA1A</i> i el torticoli paroxístic benigne del lactant	145
	iii. El gen <i>CACNA1A</i> i l'hemiplegia alternant de la infància	146
	d. El gen <i>ATP1A3</i> : l'hemiplegia alternant de la infància i el parkinsonisme-distonia d'origen precoç	146
	e. El gen <i>PRRT2</i> : de la discinèsia paroxística cinesigènica a la migranya hemiplègica	147
	f. El gen <i>SLC2A1</i> i el dèficit de glucosa cerebral	147

g.	L'heterogeneïtat genètica de la migranya hemiplègica	148
i.	La migranya hemiplègica i el gen <i>ATP1A2</i>	148
ii.	La migranya hemiplègica i el gen <i>SCN1A</i>	148
iii.	La migranya hemiplègica i el gen <i>PRRT2</i>	148
iv.	La cerca de nous gens en migranya hemiplègica	148
h.	Mecanismes mutacionals	150
i.	Tractaments en les malalties genètiques: la teràpia gènica	151
2.	LA MIGRANYA COMUNA: UNA MALALTIA COMPLEXA	152
a.	La migranya comuna: una malaltia genètica complexa	152
b.	L'heterogeneïtat clínica de la migranya	152
c.	La base genètica de la migranya	153
i.	Consideracions sobre els resultats del GWAS en migranya sense aura	153
ii.	Consideracions generals sobre els GWAS realitzats en migranya	153
iii.	Consideracions generals sobre els Exome chip en migranya	154
d.	La base epigenètica de la migranya	154
i.	Consideracions sobre els resultats de l'estudi de metilació de l'ADN en un model de migranya	155
ii.	Metilòmica vs transcriptòmica: comparació dels resultats de metilació de l'ADN amb l'anàlisi de l'expressió gènica	159
e.	Genètica i epigenètica de la migranya	160
f.	Perspectives de futur en l'estudi genètic de la migranya	160
	CONCLUSIONS	163
	APÈNDIX 1. Caracterització dels gens més rellevants citats en aquesta tesi	165
	APÈNDIX 2. Cerca de factors genètics involucrats en la cronificació de la migranya mitjançant un estudi d'associació genètica	169
	APÈNDIX 3. Les mutacions en el gen <i>SZT2</i> causen encefalopatia infantil amb epilèpsia i dismòrfia del cos callós	179
	BIBLIOGRAFIA	187

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Resum general de les entitats clíniques incloses en la versió beta de la tercera edició de la Classificació Internacional de les Cefalees (ICHD, 2013).

Taula 2. Criteris diagnòstics del torticolí paroxístic benigne del lactant establerts per la ICHD-III β .

Taula 3. Criteris diagnòstics de l'hemiplegia alternant de la infància establerts per la ICHD-III β .

Taula 4. Classificació de la migranya segons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

Taula 5. Criteris diagnòstics de la migranya sense aura segons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

Taula 6. Criteris diagnòstics de la migranya amb aura segons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

Taula 7. Criteris diagnòstics de la migranya hemiplègica segons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

Taula 8. Classificació dels models animals de migranya més importants.

Taula 9. Fàrmacs usats per determinar l'efecte sobre la depressió cortical propagant.

Taula 10. Resum dels resultats més rellevants obtinguts mitjançant estudis de lligament en formes comunes de migranya.

Taula 11. Resum dels gens i dels loci associats a migranya mitjançant estudis d'associació a nivell genòmic (GWAS).

Taula 12. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *PRRT2*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors.

Taula 13. Taula resum dels resultats de l'anàlisi mutacional dels 10 pacients de DPC.

Taula 14. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *SLC2A1*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors.

Taula 15. Taula resum dels resultats de l'anàlisi mutacional dels 5 pacients de GLUT1DS.

Taula 16. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *SCN1A*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors.

Taula 17. Característiques de les 62 variants de l'exoma de l'individu afecte de MH situades dins la regió de lligament.

Taula 18. Seqüència nucleotídica dels encebadors, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors de l'anàlisi de les variants candidates de l'exoma.

Taula 19. Resum de les mutacions trobades en els diferents estudis genètics presentats en aquesta tesi.

Taula 20. Característiques més rellevants dels gens descrits en aquesta tesi.

ÍNDIX DE FIGURES

- Figura 1.** Representació gràfica de la prevalença de la migranya en relació a l'edat en homes i dones.
- Figura 2.** Representació de les característiques de les cinc fases de la migranya.
- Figura 3.** Representació de l'avançament de la depressió cortical propagant (DCP).
- Figura 4.** Zones de l'escorça cerebral que es poden veure implicades en els diferents tipus d'aura.
- Figura 5.** Model de depressió cortical propagant proposat per M. A. Dahlem.
- Figura 6.** Factors desencadenants i moduladors de la depressió cortical propagant.
- Figura 7.** Relació entre malalties genètiques rares o comunes i la freqüència i l'efecte dels al·lèls causants.
- Figura 8.** Representació de les proteïnes causants de la migranya hemiplègica de tipus 1, 2 i 3 a la sinapsi glutamatèrgica.
- Figura 9.** Efecte de la metilació de l'ADN en diferents regions genòmiques.
- Figura 10.** Bisulfitació de l'ADN.
- Figura 11.** Reaccions enzimàtiques dutes a terme durant la piroseqüenciació.
- Figura 12.** Efecte de l'epigenètica en la migranya.
- Figura 13.** Pedigris pertanyents als individus amb DPC sequenciats pel gen *PRRT2* i electroferogrames de les regions genòmiques que inclouen les mutacions trobades.
- Figura 14.** Representació del transportador de glucosa GLUT1 i de les mutacions trobades en 3 pacients de GLUT1DS.
- Figura 15.** Resultats del MLPA del gen *SLC2A1* del pacient NP0063 i dels seus progenitors.
- Figura 16.** Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.615C>G del gen *DPYSL4*.
- Figura 17.** Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.823G>A del gen *LRIT2*.
- Figura 18.** Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.20415C>G del gen *SYNE2*.
- Figura 19.** Representació esquemàtica dels grups usats en l'estudi de metilació de l'ADN en un model de migranya.

ABREVIATURES

- 3'UTR:** regió 3' transcrita però no traduïda d'un gen (de l'anglès *untranslated region*)
- 5'UTR:** regió 5' transcrita però no traduïda d'un gen (de l'anglès *untranslated region*)
- ADN:** àcid desoxirribonucleic
- AINEs:** antiinflamatoris no esteroïdals
- ARN:** àcid ribonucleic
- CGI:** illes CpG
- CpG:** "C-phosphate-G", citosina unida a una guanina per un grup fosfat
- DCP:** depressió cortical propagant
- DNMTs:** ADN metiltransferasa
- DPC:** discinèsia paroxística cinesigènica
- DYT12:** parkinsonisme-distonia d'origen precoç
- EPP:** extravasació de proteïnes plasmàtiques
- GLUT1DS:** síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1
- GWAS:** estudi d'associació a nivell genòmic (de l'anglès: *genome-wide association study*)
- HAI:** hemiplegia alternant de la infància
- ICHD:** classificació internacional de les cefalees (de l'anglès: *International Classification of Headache Disorders*)
- ICHD-IIIβ:** edició beta de la tercera classificació internacional de les cefalees
- MA:** migranya amb aura
- MAF:** freqüència de l'al·lel minoritari (de l'anglès *minor allele frequency*)
- Mb:** mega bases
- MBD:** domini proteic d'unió a grups metil
- MC:** migranya crònica
- MEF:** migranya d'elevada freqüència
- MH:** migranya hemiplègica
- MLPA:** Amplificació multiplex dependent de lligació de la sonda (de l'anglès *multiplex ligation dependent probe amplification*)
- MO:** migranya sense aura
- OR:** mesura estadística que quantifica la força de l'associació estadística entre una exposició i una malaltia (de l'anglès *odds ratio*)
- pb:** parells de bases
- PCR:** reacció en cadena de la polimerasa
- SAM:** S-adenosilmetionina, donador de grups metil en el procés de metilació de l'ADN
- SNP:** polimorfisme d'un sol nucleòtid
- TPBL:** torticoli paroxístic benigne del lactant
- vs:** versus

INTRODUCCIÓ

Aquesta tesi s'ha dut a terme en el grup de recerca de Neurologia Pediàtrica de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron amb la col·laboració del Grup de Cefalees i Dolor Neurològic de l'Institut de Recerca Vall d'Hebron i del Grup de Genètica de la Universitat de Barcelona. Aquest fet ha permès l'estudi de diferents trastorns neurològics paroxístics, tant pediàtrics com de l'adult.

Els trastorns neurològics paroxístics engloben un conjunt heterogeni de trastorns que afecten el correcte funcionament del sistema nerviós i que es caracteritzen per la presència d'episodis de crisis amb les característiques específiques de cadascun dels trastorns.

1. TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS PEDIÀTRICS

Dins els trastorns neurològics paroxístics, els pediàtrics són aquells que es desenvolupen en l'edat pediàtrica, és a dir, des del naixement fins als 16 anys d'edat. La majoria són trastorns benignes i comuns, com ara els espasmes del plor i les lipotímies, o bé les formes precoces de presentació de malalties complexes, com les cefalees episòdiques o l'epilèpsia. Existeix, però, un grup de trastorns rars i poc estudiats, en els quals la simptomatologia i el patró d'herència ha portat a sospitar-ne una base monogènica i, en molts dels casos, un vincle amb el grup de les canalopaties neuronals. La dificultat en el seu estudi deriva, majoritàriament, de la manca de sèries importants de pacients de les quals se'n puguin obtenir conclusions extrapolables. L'interès d'aprofundir en el seu coneixement, a banda del propi interès científic, rau en trobar les causes que els originen i, així, poder trobar un tractament contra aquests trastorns, millorar la qualitat de vida dels pacients que els sofreixen i/o poder oferir consell genètic als familiars dels individus afectes.

Ens centrarem en l'estudi de 4 trastorns neurològics paroxístics pediàtrics diferents, dels quals hem pogut obtenir mostres de pacients afectats. Concretament, estudiarem el torticolí paroxístic benigne del lactant, l'hemiplegia alternant de la infància, la discinèsia paroxística cinesigènica i la síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1.

El torticolí paroxístic benigne del lactant i l'hemiplegia alternant de la infància són dos trastorns que, degut a la seva relació directa o indirecta amb les cefalees com a síndromes precursors de migranya, han estat inclosos en la Classificació Internacional de les Cefalees (ICHD), classificació que ha estat realitzada per la *International Headache Society* (IHS).

La IHS, constituïda l'any 1982, està formada per un grup d'experts en la caracterització i el diagnòstic de les cefalees. L'any 1988 va crear la primera classificació sistemàtica i universal de les cefalees, anomenada Classificació Internacional de les Cefalees (ICHD) (ICHD, 1988). Aquesta classificació ha estat àmpliament utilitzada, analitzada i revisada des de llavors. Fruit d'aquesta revisió, l'any 2004 la IHS va publicar la segona edició de la classificació (ICHD-II) (ICHD, 2004) i l'any 2013 la versió beta de la tercera edició (ICHD-IIIβ) (ICHD, 2013). A la taula 1 es recull el resum general de les entitats clíniques incloses en la ICHD-IIIβ.

Taula 1. Resum general de les entitats clíniques incloses en la versió beta de la tercera edició de la Classificació Internacional de les Cefalees (ICHD, 2013).

CLASSIFICACIÓ INTERNACIONAL DE LES CEFALEES (versió beta de la tercera edició)	
PART I. CEFALEES PRIMÀRIES	
1.	Migranya
2.	Cefalea tensional
3.	Cefalees trigemino-autonòmiques
4.	Altres cefalees primàries
PART II. CEFALEES SECUNDÀRIES	
5.	Cefalea atribuïda a trauma cranial o cervical
6.	Cefalea atribuïda a trastorn vascular cranial i/o cervical
7.	Cefalea atribuïda a trastorn intracranial no vascular
8.	Cefalea atribuïda a l'administració o la supressió d'una substància
9.	Cefalea atribuïda a una infecció
10.	Cefalea atribuïda a un trastorn de l'homeostasi
11.	Cefalea o dolor facial atribuïda a trastorns del crani, coll, ulls, oïdes, nas, sinus, dents, boca o d'altres estructures facials o cervicals
12.	Cefalea atribuïda a trastorns psiquiàtrics
PART III. NEUROPATIES CRANIALS DOLOROSES, ALTRES DOLORS FACIALS I ALTRES CEFALEES	
13.	Neuropaties cranials doloroses i alters dolors facials
14.	Altres cefalees

B. TORTICOLI PAROXÍSTIC BENIGNE DEL LACTANT

El torticoli paroxístic benigne del lactant (TPBL) és una síndrome caracteritzada per la presència de crisis recurrents d'inclinació del cap cap a un costat que remeten espontàniament. La prevalença d'aquesta malaltia no és coneguda i, a més a més, la seva naturalesa benigne indica que probablement no tots els casos són diagnosticats i encara menys descrits a la literatura.

Les crisis característiques del TPBL comencen durant la lactància, duren de minuts a dies i acostumen a repetir-se mensualment. A part del torticoli, les crisis van acompanyades d'un o més dels símptomes següents: pal·lidesa, irritabilitat, malestar, vòmits i/o atàxia.

Normalment aquesta síndrome millora cap als 2 anys de vida i remet espontàniament entre els 3 i 5 anys, tot i que sovint evoluciona cap a altres trastorns neurològics paroxístics com són la migranya amb aura, el vertigen paroxístic benigne o l'atàxia episòdica.

Els criteris diagnòstics del TPBL establerts per la ICHD-III β queden resumits a la taula 2.

TORTICOLI PAROXÍSTIC BENIGNE DEL LACTANT

A. Crisis recurrents en infants que compleixen els criteris dels apartats B i C.

B. Inclinió del cap cap a un costat, amb o sense rotació suau d'aquest, que dura entre minuts i dies i remet espontàniament.

C. Com a mínim es dona un dels següents símptomes:

1. Pal·lidesa
2. Irritabilitat
3. Malestar
4. Vòmits
5. Atàxia

D. L'exploració neurològica entre les crisis és normal.

E. No és atribuïble a cap altre malaltia.

Taula 2. Criteris diagnòstics del torticoli paroxístic benigne del lactant establerts per la ICHD-III.

En la darrera classificació de les cefalees, el TPBL ha estat inclòs dins l'apartat de "Síndromes episòdiques probablement associades a la migranya". En aquest grup s'hi inclouen les síndromes que es donen en pacients que també presenten migranya amb o sense aura o bé tenen una alta probabilitat de desenvolupar-la. Fins ara s'havien descrit com síndromes de la infància, però també poden donar-se en adults.

C. HEMIPLEGIA ALTERNANT DE LA INFÀNCIA

L'hemiplegia alternant de la infància (HAI) és una síndrome rara i complexa que va ser descrita per primera vegada l'any 1971 (Verret and Steele, 1971). Es caracteritza pel desenvolupament de crisis hemiplègiques que involucren un o l'altre costat del cos amb una durada d'entre minuts i varis dies. La prevalença de la malaltia s'ha estimat a partir dels pacients reclutats en un estudi danès en 1:1,000,000 (Hoei-Hansen et al., 2013).

Les crisis d'HAI poden ser desencadenades per factors emocionals, per traumes cranials o per cansament, entre d'altres. Durant o independentment de les crisis hemiplègiques, també es poden donar crisis de quadriplegia d'intensitat variable i/o altres manifestacions paroxístiques, com per exemple episodis tòncics i distònics o moviments oculars anormals. La simptomatologia d'aquesta síndrome s'inicia abans dels 18 mesos de vida, fet que el diferencia d'altres trastorns paroxístics neurològics pediàtrics com pot ser la migranya hemiplègica. A part dels símptomes paroxístics, els pacients també presenten un retard en el desenvolupament, corees, distonia i/o atàxia, essent característica la recuperació parcial o total després d'un període de son.

Els criteris diagnòstics de l'HAi establerts per la ICHD-III β queden resumits a la taula 3.

HEMIPLEGIA ALTERNANT DE LA INFÀNCIA
A. Crisis recurrents d'hemiplegia alternant entre els dos costats del cos que compleixin els criteris dels apartats B i C.
B. Inici abans dels 18 mesos de vida.
C. Com a mínim es dona un altre fenomen paroxístic associat a o independent de les crisis d'hemiplegia, com per exemple crisis tòniques i distòniques, moviments coreics, nistagmes o altres moviments oculars anormals i/o perturbacions autonòmiques.
D. Presència de dèficit mental o neurològic.
E. No és atribuïble a cap altre malaltia.

Taula 3. Criteris diagnòstics de l'hemiplegia alternant de la infància establerts per la ICHD-III β .

En la darrera classificació de les cefalees, l'HAi ha estat inclosa a l'apartat de "Síndromes episòdiques que podrien estar associades amb la migranya" de l'Apèndix A1. En aquest grup també s'hi ha inclòs els còlics infantils i la migranya vestibular.

D. DISCINÈSIA PAROXÍSTICA CINESIGÈNICA

La discinèsia paroxística cinesigènica (DPC) és un trastorn neurològic del moviment caracteritzat pel desenvolupament d'episodis de moviments involuntaris provocats per moviments voluntaris sobtats (Kertesz, 1967). La prevalença de la malaltia s'estima en un 1:150,000.

Els episodis que caracteritzen els pacients de DPC són episodis de curta durada, entre segons i minuts, que acostumen a repetir-se nombroses vegades en un mateix dia i que sovint van acompanyats de distonia, corea, atetosi i/o bal·lisme. Durant els episodis no hi ha pèrdua ni alteració de la consciència.

El pronòstic de la DPC és favorable i, a més a més, els pacients normalment presenten una resposta positiva a l'ús de medicaments antiepilèptics.

E. SÍNDROME DE LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1

La síndrome de la deficiència del transportador de glucosa de tipus 1 (GLUT1DS) és una malaltia neurològica causada per una deficiència en el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica. La prevalença de la GLUT1DS s'estima al voltant de 1:90,000.

Aquesta malaltia va ser descrita per primera vegada en dos lactants amb epilèpsia rebel al tractament, convulsions, greu retard en el desenvolupament neurològic i motor, microcefàlia adquirida i atàxia (De Vivo et al., 1991). Des de llavors, s'han descrit pacients amb la GLUT1DS amb un fenotip més lleu caracteritzat per la presència de diferents fenòmens neurològics paroxístics, com per exemple les atàxies episòdiques, les discinèsies induïdes per l'exercici (Suls et al., 2008; Weber et al., 2008) o les absències epilèptiques (Suls et al., 2009).

La detecció precoç de la GLUT1DS és de gran importància ja que existeix un tractament basat en l'aplicació d'una dieta cetogènica. Aquest tractament disminueix sobretot la presència de convulsions, però també contribueix en frenar el retard mental degut a la manca de glucosa present al líquid cefaloraquídi (Klepper et al., 2004) i, per tant, de la principal font d'energia pel correcte funcionament neuronal.

2. TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS DE L'ADULT: LA MIGRANYA

Els trastorns neurològics paroxístics de l'adult es manifesten com a crisis paroxístiques principalment a l'edat adulta, tot i no ser excepcional la seva presentació dins l'edat pediàtrica. Ens centrarem en l'estudi d'un dels trastorns neurològics paroxístics més comuns: la migranya.

A. CARACTERÍSTIQUES GENERALS

La migranya és un trastorn neurològic primari molt prevalent que es manifesta amb crisis episòdiques i recurrents de mal de cap incapacitant, pulsatiu i sovint unilateral, que empitjora amb el moviment i que pot anar acompanyat de nàusees, vòmits, fotofòbia i/o fonofòbia (ICHD, 2013).

Una crisi típica de migranya dura entre 4 i 72 hores i es divideix en 5 fases: (1) Síntomes premonitoris o Pròdrom, (2) Aura, (3) Cefalea, (4) Resolució i (5) Recuperació. No és necessari que es desenvolupin les cinc fases per a definir la crisi com un atac de migranya.

L'exploració neurològica durant i entre els episodis acostuma a ser normal, excepte durant la fase d'aura, en aquells pacients que la pateixen.

B. DIAGNÒSTIC

La manca de biomarcadors indicatius de la presència de migranya i l'heterogeneïtat en la manifestació dels símptomes clínics d'aquesta, dificulten l'assignació d'un diagnòstic específic per a cada pacient migranyós. Per això és important realitzar una anamnesi correcta, detallada i precisa per tal d'arribar al diagnòstic adequat de la malaltia. La classificació internacional de les cefalees realitzada per la IHS ha permès establir criteris sistemàtics i universals que permeten una correcta classificació dels diferents tipus de migranya amb una explicació clara i concisa de la seva simptomatologia.

Com es pot veure a la taula 1, el primer apartat de la ICHD-III β està dedicat a la migranya i els seus subtipus. A la taula 4 es detalla la classificació dels diferents subtipus de migranya inclosos en aquesta classificació: En els següents apartats procediré a la descripció dels subtipus de migranya més rellevants per a la Introducció d'aquesta tesi: la migranya sense aura, la migranya amb aura i la migranya hemiplègica.

MIGRANYA

1. Migranya sense aura (M0)
2. Migranya amb aura (MA)
 - 2.1 Migranya amb aura típica
 - 2.1.1 Aura típica amb cefalea
 - 2.1.2 Aura típica sense cefalea
 - 2.2 Migranya amb aura del tronc encefàlic
 - 2.3 Migranya hemiplègica (MH)
 - 2.3.1 Migranya hemiplègica familiar (MHF)
 - 2.3.1.1 Migranya hemiplègica familiar tipus 1 (MHF 1)
 - 2.3.1.2 Migranya hemiplègica familiar tipus 2 (MHF 2)
 - 2.3.1.3 Migranya hemiplègica familiar tipus 3 (MHF 3)
 - 2.3.1.4 Migranya hemiplègica familiar, altres loci
 - 2.3.2 Migranya hemiplègica esporàdica (MHE)
 - 2.4 Migranya retiniana
3. Migranya crònica
4. Complicacions de la migranya
 - 4.1 Estatus migranyós
 - 4.2 Aura persistent sense infart
 - 4.3 Infart migranyós
 - 4.4 Crisis comicials desencadenades per migranya
5. Probable migranya
 - 5.1 Probable migranya sense aura
 - 5.2 Probable migranya amb aura
6. Síndromes episòdics probablement associats a la migranya
 - 6.1 Pertorbació gastrointestinal recurrent
 - 6.1.1 Síndrome dels vòmits cíclics
 - 6.1.2 Migranya abdominal
 - 6.2 Vertigen paroxíctic benigne
 - 6.3 Torticolí paroxíctic benigne del lactant

Taula 4. Classificació dels subtipus de migranya segons la ICHD-IIIβ (ICHD, 2013).

i. La migranya sense aura

La migranya sense aura (MO) és el subtipus de migranya més freqüent, representant aproximadament el 80% de tots els casos de migranya. Les crisis de MO duren entre 4 i 72 hores i es caracteritzen per la presència de cefalees recurrents normalment unilaterals, pulsatives, d'intensitat moderada o severa, que s'agreugen amb l'activitat física i van associades a nàusees i/o fotofòbia i fonofòbia.

Els criteris diagnòstics de la MO establerts per la ICHD-III β queden resumits a la taula 5.

MIGRANYA SENSE AURA
A. Com a mínim 5 episodis que compleixin els criteris B, C i D.
B. Cefalea d'entre 4 i 72 hores de durada (no tractada o amb tractament ineficaç).
C. Cefalees amb un mínim de 2 de les següents característiques: <ol style="list-style-type: none"> 1. Localització unilateral 2. Pulsativa 3. Intensitat del dolor moderada o severa 4. Implica l'evitació de o es veu agreujada per l'activitat física rutinària (per exemple, caminar o pujar escales)
D. La cefalea va acompanyada de com a mínim un dels següents símptomes: <ol style="list-style-type: none"> 1. Nàusees i/o vòmits 2. Fotofòbia i fonofòbia
E. No és atribuïble a cap altre diagnòstic de la ICHD-III β .

Taula 5. Criteris diagnòstics de la migranya sense aurasegons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

ii. La migranya amb aura

La migranya amb aura (MA) és el segon subtipus de migranya més freqüent. Es caracteritza per la presència d'alteracions visuals, sensitives, del llenguatge o d'altres del sistema nerviós central, totalment reversibles, que es desenvolupen gradualment, tenen una durada de varis minuts fins a una hora i normalment van seguides de cefalea i d'altres símptomes associats a migranya. Aquests símptomes de disfunció neurològica reben el nom d'aura

i acostumen a precedir la cefalea, tot i que també poden iniciar-se en el mateix moment o després que aquesta o fins i tot poden donar-se sense la presència de cefalea. Existeixen diferents tipus d'aura, sent la visual la més freqüent (es dona en el 90% dels casos), seguida de la sensitiva, l'aura del llenguatge i sent la motora la menys freqüent (aquesta darrera és característica de la migranya hemiplègica).

En alguns casos, els diferents tipus d'aura es desenvolupen l'un darrera l'altre en una mateixa crisi migranyosa, començant per l'aura visual, seguint amb la sensitiva i acabant amb l'aura del llenguatge. Quan es presenta l'aura motora llavors es parla de migranya hemiplègica (veure apartat següent).

Els criteris diagnòstics de la MA establerts per la ICHD-III β queden resumits a la taula 6.

MIGRANYA AMB AURA

A. Com a mínim 2 episodis compleixen els criteris dels apartats B i C.

B. Aura amb símptomes visuals, sensitius i/o del llenguatge, tots totalment reversibles; sense símptomes motors, del tronc encefàlic ni retinians.

C. Presència de com a mínim 2 de les següents característiques:

1. Com a mínim un dels símptomes de l'aura es desencadena gradualment durant 5 minuts i/o 2 o més tipus d'aura es desencadenen successivament
2. La durada de cada aura oscil·la entre 5 i 60 minuts
3. Un mínim d'una aura és unilateral

D. No és atribuïble a cap altre diagnòstic de la ICHD-III β i tampoc està relacionat amb crisis isquèmiques transitòries.

Taula 6. Criteris diagnòstics de la migranya amb aura segons la ICHD-III β (ICHHD, 2013).

iii. La migranya hemiplègica

La migranya hemiplègica (MH) és un subtipus de migranya amb aura greu i poc freqüent. Es caracteritza per la presència d'aura amb debilitat motora.

Els criteris diagnòstics de la MH establerts per la ICHD-III β queden resumits a la taula 7.

MIGRANYA HEMIPLÈGICA

A. Com a mínim 2 episodis que compleixin els criteris dels apartats B i C.

B. Aura amb les 2 característiques següents:

1. Debilitat motora totalment reversible
2. Síntomes visuals, sensitius i/o del llenguatge totalment reversibles

C. Presència de com a mínim 2 de les següents característiques:

1. Com a mínim un dels símptomes de l'aura es desencadena gradualment durant 5 minuts i/o 2 o més tipus d'aura es desencadenen successivament
2. La durada de cada aura oscil·la entre 5 i 60 minuts, excepte l'aura motora que pot durar fins a 72 hores
3. Un mínim d'una aura és unilateral

D. No és atribuïble a cap altre diagnòstic de la ICHD-III β ni tampoc està relacionat amb crisis isquèmiques transitòries ni amb l'ictus.

Taula 7. Criteris diagnòstics de la migranya hemiplègica segons la ICHD-III β (ICHD, 2013).

Dins de la MH es distingeixen dos subtipus: la migranya hemiplègica familiar (MHF) i la migranya hemiplègica esporàdica (MHE). En el primer subtipus (MHF) com a mínim un familiar de primer o segon grau del cas índex ha de presentar migranya hemiplègica i en el segon subtipus (MHE) cap familiar de primer o segon grau del cas índex pot presentar MH. No existeixen diferències ni en la freqüència de casos ni en les característiques clíniques entre els dos subtipus.

La MH s'hereta de forma mendeliana autosòmica dominant. Fins el moment s'han identificat 3 gens responsables d'aquest tipus de migranya que cobreixen aproximadament un 30% dels casos descrits, els quals es descriuen extensament a l'apartat 3.e de la INTRODUCCIÓ.

C. COMORBIDITAT

La comorbiditat es refereix a la coexistència de dues malalties en un mateix individu amb una freqüència més elevada que l'esperada per atzar. L'estudi de la comorbiditat és molt important a l'hora de determinar el millor tractament per a cadascun dels pacients i també per a recalcar la complexitat clínica existent.

La migranya és comòrbida a diverses malalties associades a disfuncions neurològiques i vasculars. Es presenta de forma més freqüent del que s'esperaria en pacients amb malalties neurològiques (com l'ictus i l'epilèpsia), malalties psiquiàtriques (com l'ansietat, la depressió i la bipolaritat), pacients amb dolor crònic i d'altres, com per exemple l'asma i les malalties cardiovasculars (Jensen and Stovner, 2008; Bloudek et al., 2012).

També existeix una elevada comorbiditat entre la migranya i els altres tipus de cefalea descrits a la ICHD-III β . Un exemple n'és el resultat obtingut de l'estudi d'una cohort de la població danesa. En aquest es va determinar que el 94% dels migranyosos presentaven també cefalea tensional, un 9% més que la població general (Lyngberg et al., 2005).

Els estudis de comorbiditat basats en sèries clíniques poden veure's esbiaixats degut a que si un individu està afectat per dues malalties diferents, és més probable que requereixi atenció mèdica (Berkson, 1946). També poden donar-se errors deguts al solapament de la simptomatologia entre ambdues condicions mèdiques o bé deguts a l'existència d'una relació de causalitat.

També pot ser que la comorbiditat existent es degui a la presència de factors genètics comuns que augmentin el risc de presentar ambdues malalties. L'estudi d'aquests factors genètics comuns és una de les vies per entendre els mecanismes subjacents de la migranya.

D. EPIDEMIOLOGIA

Durant la darrera dècada, la publicació de la segona classificació internacional de les cefalees (ICHD-II) i la posada en marxa de diferents campanyes arreu del món per conscienciar la població de la gran magnitud, la gran càrrega i l'alt impacte que té la migranya a nivell econòmic i social han potenciat l'aparició de nombrosos estudis a nivell poblacional sobre la prevalença i l'impacte que té aquesta malaltia.

En el darrer estudi publicat sobre l'epidemiologia de la migranya on es fa una revisió de les dades aportades per diferents estudis realitzats a nivell mundial, tots seguint els criteris diagnòstics establerts per la ICHD-II, es calcula que la prevalença de la migranya és de l'11.5% i la prevalença de la migranya probable és del 7%, considerant ambdues es calcula una prevalença total del 18.5% (Merikangas, 2012). Tant en aquest estudi com en els anteriors, està àmpliament descrit que la prevalença de la migranya varia en funció de l'àrea geogràfica d'estudi: així, a Europa (Stovner and Andree, 2010; Ayzenberg et al., 2012; Linde et al., 2012) i Amèrica del Nord (Serrano et al., 2013) la prevalença es situa entre el 15 i el 30%, i en canvi a d'altres regions com Àfrica (Ofowwe and Ofili, 2010; Gelaye et al., 2013; Mengistu and Alemayehu, 2013) i Àsia (Eikermann-Haerter et al., 2011; Ishii et al., 2013) aquesta es situa entre el 4 i el 13.5% (WHO, 2011). És difícil determinar si aquesta desigualtat és real i es basa en les diferències genètiques i ambientals i en el diferent estil de vida de les poblacions estudiades, o bé si és irreal i es deu a diferències metodològiques a l'hora de realitzar els estudis, com poden ser, per exemple,

les característiques de la mostra analitzada, la formulació de les preguntes o bé l'aplicació dels criteris diagnòstics (Anttila et al., 2010).

A part de les diferències a nivell geogràfic, existeixen diferències en la prevalença de la migranya en funció del sexe i l'edat de l'individu. En relació al sexe, la ràtio entre homes i dones adults amb migranya varia entre 1:2 i 1:3 (Jensen and Stovner, 2008). En canvi, a l'edat prepuberal no existeixen diferències entre nens i nenes. Així, tal i com es veu a la figura 1, podem dir que la prevalença de la migranya augmenta amb l'edat (de forma més pronunciada en les dones, després de la menarquia) fins que s'assoleix un màxim cap a la quarta dècada de la vida, moment en el qual torna a baixar fins a assolir els nivells de l'edat prepuberal (Jensen and Stovner, 2008).

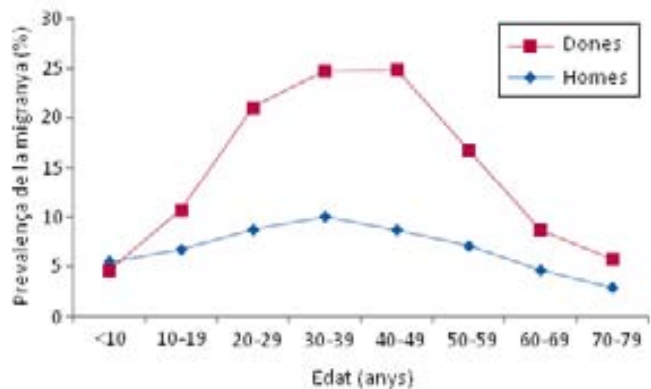


Figura 1. Representació gràfica de la prevalença de la migranya en relació a l'edat en homes i dones. Figura adaptada de (Jensen and Stovner, 2008).

E. IMPACTE SOCIOECONÒMIC

En la darrera enquesta de l'impacte global de les malalties realitzada l'any 2010 per l'Organització Mundial de la Salut (Vos et al., 2013), la migranya va ser classificada com la tercera malaltia més prevalent i com la setena causa específica de discapacitat a nivell mundial.

A part de l'impacte social, el cost econòmic de la migranya és molt elevat. Per una banda, existeixen els costos directes de la migranya, els quals són bàsicament els costos sanitaris relacionats amb el tractament de la malaltia, com són el diagnòstic, l'atenció ambulatoria, l'hospitalització i el tractament. Per altra banda, existeixen els costos indirectes, els quals es deuen a que la prevalença de la migranya és major en l'època laboral de les persones, fet que provoca que es perdin hores de feina i que la productivitat laboral sigui menor. Per tenir una idea aproximada, s'estima que el cost de la migranya a la Unió Europea és de 111 bilions d'euros l'any i, considerant només Espanya, s'estima un cost de 20 bilions d'euros l'any (Linde et al., 2012).

F. FISIOPATOLOGIA

i. La crisi de migranya

Les crisis típiques de migranya es divideixen en 5 fases: (1) Síntomes premonitoris o Pròdrom, (2) Aura, (3) Cefalea, (4) Resolució i (5) Recuperació (Blau, 1992; Charles, 2013). Tot i això, perquè una crisi migranyosa sigui considerada com a tal, no cal que es desenvolupin les cinc fases. Un clar exemple en són les crisis de migranya sense aura, les quals, tal i com indica el nom, no presenten la fase d'aura.

Les característiques de cadascuna de les fases estan representades a la figura 2. D'aquesta figura en podem extreure la complexitat que representa una crisi migranyosa. Fins i tot des de dies abans de patir el mal de cap (durant la fase de pròdrom), el cervell migranyós comença a experimentar fenòmens complexes com són el cansament, la retenció de líquids i la percepció incrementada de diferents estímuls sensorials.

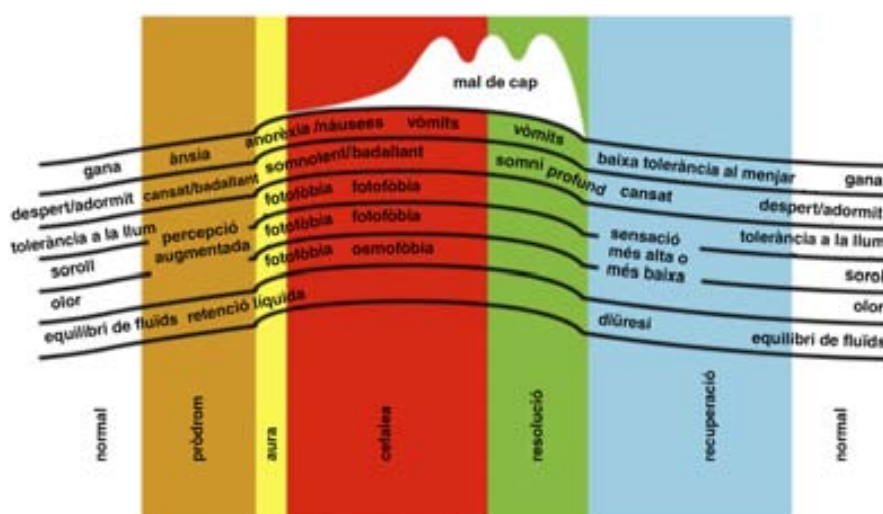


Figura 2. Representació de les característiques de les cinc fases de la migranya.

La fase de pròdrom es caracteritza per l'ansia per menjar, el cansament, els badalls, la percepció augmentada de la llum, el soroll i les olors i la retenció de fluids. Durant l'aura es pot donar anorèxia o nàusees, somnolència i badalls i es caracteritza per l'inici dels símptomes característics de la fase de la cefalea, els quals inclouen fotofòbia, fonofòbia i osmofòbia. Durant la resolució es poden donar vòmits i somni profund. La darrera fase, la recuperació, inclou una baixa tolerància al menjar, cansament, una sensibilitat més alta o més baixa a la llum, el soroll i l'olor i diüresi.

Les característiques de les fases de la crisi migranyosa poden donar-nos informació important per entendre més aquesta malaltia. Per exemple, la hipersensibilitat als estímuls sensitius, com són la llum, el soroll i l'olor, experimentada durant la fase premonitòria està estretament lligada al que molts pacients descriuen com a desencadenants de la crisi, que són l'exposició a la llum molt potent i als sorolls i a les olors molt fortes. Podria ser que els pacients migranyosos tinguin un llindar més baix de sensibilitat sensorial que els faci ser susceptibles a aquest tipus de desencadenants. O bé, també podria ser que molts pacients identifiquin com a desencadenants determinats estímuls sensorials als quals són més sensibles perquè la crisi aguda de migranya en realitat ja ha començat.

ii. Les teories vascular, neuronal i neurovascular de la migranya

La fisiopatologia de la migranya és encara poc coneguda. De fet, no existeix una única teoria que expliqui la complexitat de tots els fenòmens que caracteritzen aquesta malaltia, sinó que actualment coexisteixen dues teories sobre la fisiopatologia de la migranya: la teoria vascular i la teoria neuronal.

La teoria vascular de la migranya va ser proposada inicialment per Thomas Willis a finals del segle XVII. Willis va teoritzar que el dolor de la migranya es deuria a la dilatació dels vasos cranials (Grand, 1999). Aquesta teoria va anar prenent força al llarg dels segles posteriors amb les observacions fetes per Harold Wolff (Wolff and Tunis, 1952), qui va suggerir que si bé el mal de cap es deuria a una vasodilatació, l'aura es deuria a una vasoconstricció.

Paral·lelament al desenvolupament de la teoria vascular, l'any 1873 Edward Liveing va indicar per primera vegada que l'origen de la migranya es trobava al cervell, iniciant així el desenvolupament de la teoria neuronal. Aquesta teoria va ser reforçada pels estudis publicats l'any 1984 per Michael Moskowitz. Els resultats d'aquests estudis indicaven que els axons trigeminovasculars provinents dels vasos sanguinis de la piamàter i la duramàter alliberaven pèptids vasoactius que provocaven una inflamació estèril acompanyada de dolor (Moskowitz, 1984). Durant la inflamació neurogènica, el gangli del trigemin s'estimularia provocant l'extravasació de proteïnes neurogèniques, entre les quals hi ha pèptids vasodilatadors, com el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) i la substància P. El sistema trigeminovascular està format per neurones del nervi trigemin que innerven els vasos sanguinis cerebrals i d'altres que projecten cap al nucli caudal del trigemin, situat al tronc encefàlic, que alhora projecta cap als centres del dolor (Noseda and Burstein, 2013).

La teoria neuronal proposa també l'existència d'una disfunció neuronal que provocaria un estat d'hiperexcitabilitat cortical neuronal (Pietrobon and Striessnig, 2003) que permetria el desenvolupament i la propagació de la depressió cortical propagant (DCP).

Actualment no existeixen evidències definitives que permetin excloure la teoria vascular o la teoria neurogènica. De fet, existeix una tendència cap a la teoria neurovascular de la migranya, la qual indica que la migranya és el resultat d'una disfunció neuronal que desencadena determinats esdeveniments que indueixen l'activació i la sensibilització del sistema trigeminovascular, produint l'aparició d'una inflamació neurogènica i la conseqüent resposta vascular mediada per diferents agents bioquímics.

De fet, els tractaments aguts utilitzats actualment per cessar la migranya presenten una combinació d'efectes basats en ambdues teories. D'una banda produeixen una vasoconstricció cranial i d'altra inhibeixen el sistema trigeminovascular (Villalon et al., 2003).

iii. La depressió cortical propagant i l'aura

La depressió cortical propagant (DCP) és una onada transi-tòria de despolarització neuronal i glial que s'estén a través de l'escorça cerebral i que va seguida d'una depressió de llarga durada de l'activitat neuronal espontània i evocada. Aquesta ona es propaga lentament, a una velocitat d'en-tre 2 i 5mm/min, a través del teixit cerebral. A la figura 3 s'observa una representació de com avança la DCP des de la zona on s'origina, típicament la regió occipital, cap a la regió frontal durant una crisi típica de migranya amb aura.

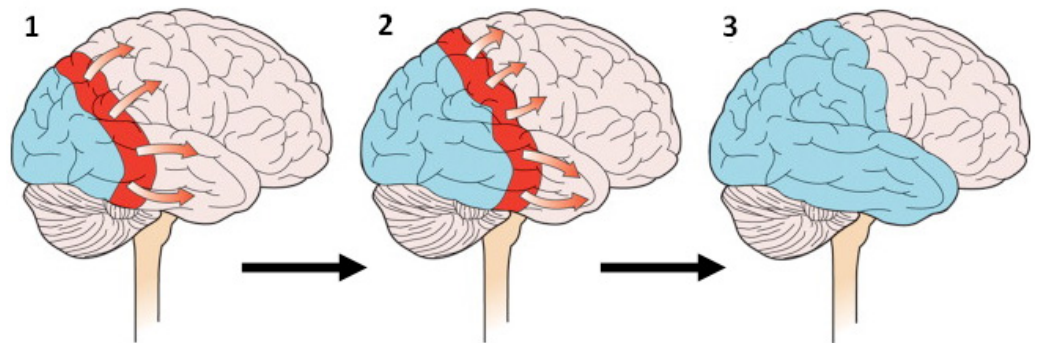


Figura 3. Representació de l'avançament de la depressió cortical propagant (DCP).

La franja vermella es correspon amb la despolarització neuronal i glial, les fletxes indiquen la direcció cap a on avança la DCP i la regió blava indica la regió amb el flux sanguini disminuït.

La DCP va ser observada per primera vegada per Leão l'any 1944 en estimular elèctricament el còrtex cerebral en conills (Leao, 1944). Des de llavors s'han realitzat nombrosos estudis per determinar els mecanismes subjacents de la DCP, així com la seva implicació clínica. En un estudi realitzat en humans on es mesurava el flux sanguini d'una regió del cervell durant l'aura migranyosa, es va detectar que els pacients patien un increment inicial i curt del flux sanguini seguit d'un descens prolongat d'aquest i que aquestes variacions en el flux sanguini s'anaven propagant al llarg del teixit cerebral (Olesen et al., 1981). Aquesta observació feta en humans es va confirmar a posteriori en rates, on es va veure que la DCP coincidia amb variacions

en el flux sanguini i que ambdós fenòmens es propagaven a una velocitat constant (Lauritzen et al., 1982). Aquesta i d'altres troballes suggereixen que la DCP és el mecanisme subjacent de l'aura migranyosa. Un estudi potencialment conclouent d'aquesta afirmació és l'estudi de neuroimatge realitzat en 3 pacients amb migranya amb aura visual, un d'ells capaç de provocar-se la crisi migranyosa, on es va demostrar que la DCP genera l'aura a l'escorça cerebral i que existeix una clara correlació temporal i espacial entre les fases de l'aura, l'augment de l'activitat cortical i els canvis de flux sanguini a l'escorça cerebral (Hadjikhani et al., 2001).

Existeix una clara relació entre l'avançament de la DCP i els diferents subtipus d'aura. Així, quan la DCP afecta l'escorça visual, el pacient experimenta l'aura visual; quan la DCP avança fins a l'escorça sensorial, s'experimenta l'aura sensorial; el mateix passa amb l'aura del llenguatge i l'aura motora.

A la figura 4 es representen les zones de l'escorça cerebral que poden veure's implicades en els diferents tipus d'aura; en aquesta figura es pot veure que l'escorça visual és la més propera a la zona on s'origina típicament la DCP, la zona occipital, i que a mesura que avança la DCP es va trobant amb l'escorça sensorial, després l'encarregada del llenguatge i finalment la motora.

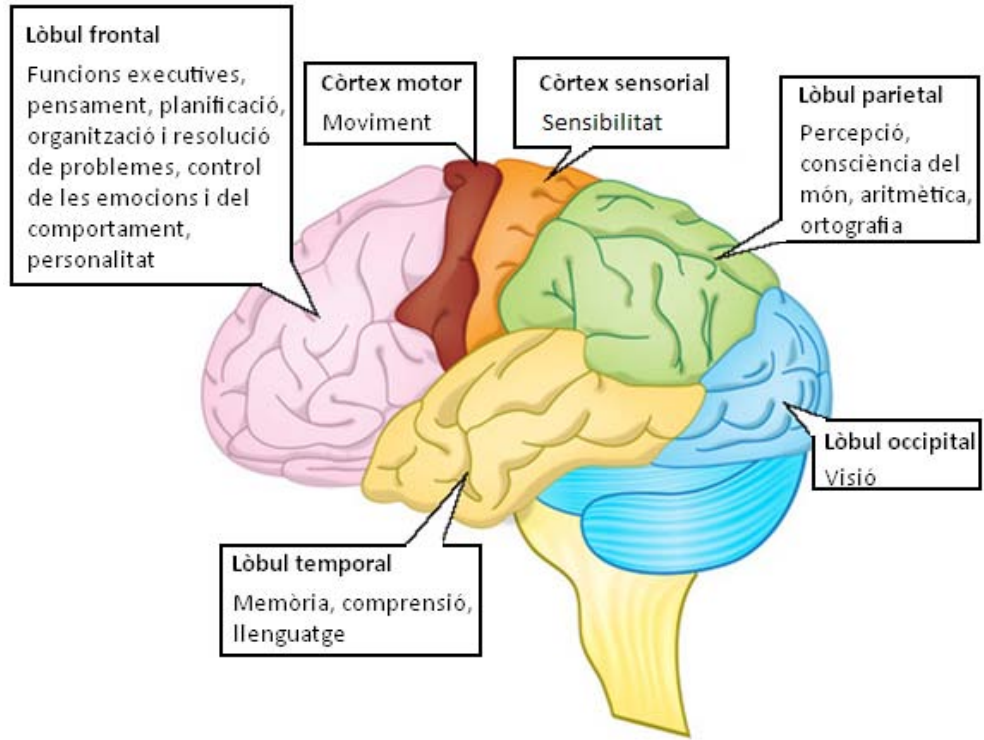


Figura 4. Zones de l'escorça cerebral que es poden veure implicades en els diferents tipus d'aura.

La DCP és un fenomen que només s'ha pogut relacionar amb la migranya amb aura. Per això, les hipòtesis que apunten que aquest fenomen sigui un dels desencadenants de la cefalea semblen contradictòries amb el fet que la majoria de pacients amb migranya no presenten aura. Fins al moment, no existeixen evidències que neguin o confirmin l'existència d'una DCP que es doni en zones silents de l'escorça cerebral, donant lloc a l'existència d'una aura silenciosa en els pacients amb migranya sense aura (Pietrobon and Striessnig, 2003). Recentment, s'ha desenvolupat una nova teoria que podria explicar aquest fet. Es tracta d'un model biofísic de la DCP on per una banda es postula que la DCP no és un fenomen que s'escampi cap

a tota l'escorça cerebral, sinó que és un fenomen que es localitza en una zona concreta degut a l'existència d'un feedback inhibitori que n'evita la seva propagació (figura 5a); i per altra banda, postula que la forma i la mida de la DCP provoquen que hi hagi o no una crisi migranyosa i que aquesta sigui amb o sense aura. Com es pot veure a la figura 5b, les DCPs circulars es correspondrien amb l'existència d'una migranya sense aura, només en el cas que s'assolís una mida suficientment gran de la zona afectada per la DCP (en cas contrari, no hi hauria crisi migranyosa); i les DCPs amb forma allargada es correspondrien amb els casos de migranya amb aura (Dahlem, 2013).

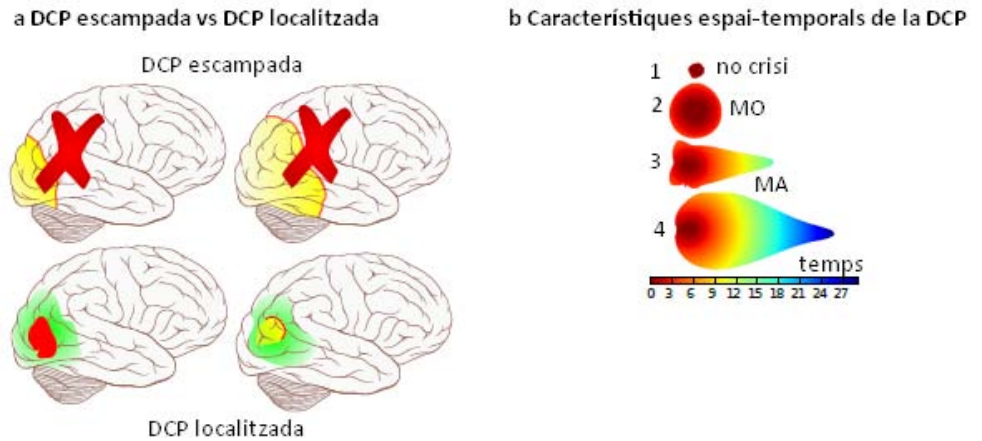


Figura 5. Model de depressió cortical propagant proposat per M. A. Dahlem. a) Comparació de la teoria de la DCP escampada en oposició a la teoria de la DCP localitzada. En la DCP localitzada, aquesta és estabilitzada degut al feedback inhibitori (en verd) que fa distingir entre una fase primerenca de la DCP (en vermell) i una fase tardana (en groc) b) Tipus de crisi migranyosa en funció de la grandària i la mida de l'àrea afectada per la DCP i del temps de durada d'aquesta. Figura adaptada de (Dahlem, 2013).

iv. La depressió cortical propagant activa el sistema trigeminovascular i la cefalea

Recentment s'han publicat diferents estudis que recolzen la idea de que la depressió cortical propagant és el fenomen que activa el sistema trigeminovascular i, per tant, la cefalea migranyosa.

D'una banda s'ha vist que una sola DCP és capaç d'incrementar l'activitat dels nociceptors de les meninges i de les neurones trigeminovasculars del complex trigeminocervical, el component central del sistema trigeminovascular, en rata (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2011). A més a més, s'ha vist que existeix un període de temps entre la DCP i l'activació trigeminal, el qual es correspon amb el temps que transcorre entre l'inici dels símptomes de l'aura visual i la posterior cefalea (Pietrobon and Moskowitz, 2012).

Fins fa poc existia una gran controvèrsia en relació a la teoria que la DCP fos el fenomen que activa el sistema trigeminovascular en una crisi de migranya. L'argument central de les teories que hi estaven en contra es basava en el fet que els mediadors alliberats com a conseqüència de la inducció de la DCP no podien mantenir-se de forma sostinguda a l'espai perivascular per induir la sensibilització prolongada del sistema trigeminal i la subseqüent cefalea d'hores de durada degut a l'existència de la barrera formada per la *glia limitans* i també pel flux creat pel líquid cefaloraquídi (Zhang et al., 2010).

Rebatent aquest argument, molt recentment s'ha postulat quina podria ser la via que uneix la DCP i l'activació del sistema trigeminovascular. S'ha demostrat que la intensa despolarització i la sobreactivació dels receptors *N-methyl-D-aspartat* (NMDA) produïdes per la DCP, activen els canals neuronals Pannexin1 (Karatas et al., 2013).

L'activació d'aquests canals indueix la formació d'una cascada inflamatòria que alhora indueix l'alliberament sostingut de mediadors proinflamatoris des de la *glia limitans* (Costa et al., 2013). Aquests mediadors són els que mantenen l'estímul sostingut necessari per sensibilitzar i activar els aferents trigeminals.

Així doncs, aquest estudi estableix que la via que relaciona la DCP i la crisi migranyosa es podria donar a través d'una resposta inflamatòria que s'encarrega de sensibilitzar i activar els aferents trigeminovasculars.

v. Desencadenants i moduladors de la depressió cortical propagant

Es desconeix quins són els factors que desencadenen la DCP. Tot i això, se sap que la DCP s'inicia quan les concentracions locals de potassi excedeixen un determinat llindar. Aquesta situació pot donar-se, per exemple, degut a una intensa activitat neuronal, a una isquèmia o a un trauma cerebral (Eikermann-Haerter and Ayata, 2010).

Existeixen evidències que indiquen que els migranyosos tenen un llindar d'activació de la DCP més baix comparat amb els individus no migranyosos. D'aquesta manera, estímuls que en un cervell no migranyós no indueixen la DCP, en un cervell migranyós sí que ho fan. Aquest fet s'ha pogut demostrar en models de MH de tipus 1 i tipus 2 on s'ha confirmat que la susceptibilitat a desenvolupar DCPs és més alta en ratolins portadors de mutacions en els gens implicats en aquesta malaltia que en els ratolins *wild-type* (Eikermann-Haerter et al., 2011; Leo et al., 2011).

Podríem dir que el desenvolupament de la DCP depèn d'interaccions complexes entre els factors desencadenants de la DCP i els factors moduladors de la seva susceptibilitat. Com es veu representat a la figura 6, els factors moduladors es divideixen en endògens, com serien la càrrega genètica i els factors hormonals, i en exògens, com els fàrmacs i factors ambientals, com per exemple els aliments, el clima i l'estrès (Eikermann-Haerter and Ayata, 2010).

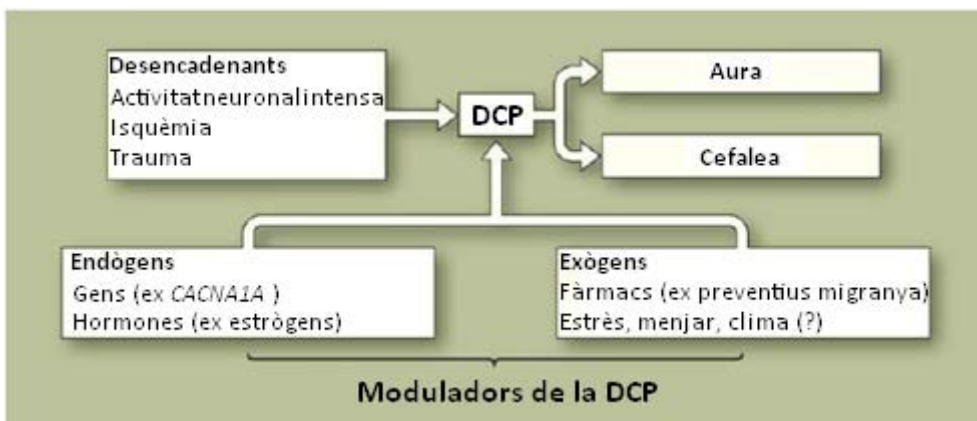


Figura 6. Factors desencadenants i moduladors de la depressió cortical propagant.

Figura adaptada de (Eikermann-Haerter and Ayata, 2010).

vi. Models animals de migranya

La possibilitat d'utilitzar models animals per a estudiar la fisiopatologia de la migranya ha permès realitzar un avanç important en el coneixement dels mecanismes i dels mediadors subjacents de les crisis migranyoses, així com el desenvolupament de nous agents terapèutics per a combatre aquesta malaltia. En els darrers anys s'han utilitzat diferents tipus de models animals de migranya. Els més importants es troben resumits a la taula 8.

Existeixen diferents models animals basats en la DCP que varien en funció de l'espècie utilitzada, el mètode d'inducció i l'ús o no d'animals *knock-in* o genomodificats.

El primer animal utilitzat com a model de DCP va ser el conill. De fet, va ser l'animal on es va observar la DCP per primera vegada (Leao, 1944). Més endavant es van començar a utilitzar models en gat (Trachtenberg et al., 1970), rata (Buresova et al., 1964) i ratolí (Ward and Sinnott, 1971). Actualment, els models més usats són en rata o bé en ratolí.

MODEL	FUNCIO O ESTRUCTURA ANALITZADA	METODOLOGIA
Vascular		
<i>In vitro</i>	Artèries i venes aïllades	Efectes de drogues, modulació de l'estimulació elèctrica
<i>In vivo</i>	Artèries caròtida i de la piamàter, anastomosis arteriovenoses	Avaluació de la resistència vascular, mesura del diàmetre
Neurovascular		
Extravasació de proteïnes plasmàtiques (EPP)	Sistema trigeminovascular	Inducció o inhibició de la EPP via estimulació elèctrica o química del gangli i avaluació de la EPP via tinció
Activació del nucli trigeminal caudal	Sistema trigeminovascular, vies centrals nociceptives	Estimulació de les meninges o del sinus sagital superior
DCP	Vasodilatació i activació de les neurones trigeminals	Estimulació química, mecànica o elèctrica del còrtex, expressió de Fos al nucli trigeminal caudal
Efectes dels donadors d'òxid nítric	Sistema trigeminovascular, vies centrals nociceptives	Resposta neuroquímica, cerebrovascular i nociceptiva a l'administració de nitroglicerina

Taula 8. Classificació dels models animals de migranya més importants. Taula adaptada de (Buzzi and Tassorelli, 2010).

Existeixen 3 mètodes d'inducció de la DCP: la inducció química, mitjançant l'aplicació de K^+ al còrtex cerebral; la inducció mecànica, clavant un objecte punxegut a la superfície del còrtex cerebral; i la inducció elèctrica, aplicant corrents elèctriques al còrtex cerebral. Dels 3 mètodes, el que ofereix menys variabilitat en els resultats és la inducció química mitjançant l'aplicació de potassi (Ayata et al., 2006).

Els models animals basats en la DCP s'han utilitzat per a estudiar diferents aspectes d'aquest fenomen i de la migranya en general. El tipus d'estudi més realitzat és l'usat per a determinar l'efecte de diferents fàrmacs sobre la DCP.

A la taula 9 es resumeixen els fàrmacs usats en diferents estudis per a determinar el seu efecte sobre la DCP, l'espècie on han estat provats, l'efecte sobre la DCP en funció de la durada del tractament i l'eficàcia clínica que tenen els fàrmacs en la migranya.

FÀRMAC		ESPÈCIE	EFECTE SOBRE LA DCP (DURADA DEL TRACTAMENT)		EFICÀCIA CLÍNICA EN MIGRANYA		REFERÈNCIA
Nom	Tipus		≤7 dies	≥1 mes	MO	MA	
α-cloralosa	Anestèsic	Rata	↓	ND	ND	ND	[Kudo et al., 2008]
Isoflurà	Anestèsic	Rata	↓	ND	ND	ND	[Kudo et al., 2008; Takagaki et al., 2013]
Pentobarbital	Anestèsic	Rata	↓	ND	ND	ND	[Kudo et al., 2008]
Uretà	Anestèsic	Rata	↓	ND	ND	ND	[Kudo et al., 2008]
A-993610	Antagonista de TRPV1	Rata	↔	ND	ND	ND	[Summ et al., 2011]
Amitriptilina	Antidepressiu	Rata	↔	↓	+	+	[Kaube and Goadsby, 1994; Ayata et al., 2006; Bogdanov et al., 2010]
Citalopram	Antidepressiu	Rata	↔/↓	ND	ND	ND	[Guedes et al., 2002]
Fluoxetina	Antidepressiu	Rata	ND	↔/↓	+	ND	[dos Santos et al., 2006]
Metisergida	Antidepressiu	Rata	↔	↓	+	+	[Ayata et al., 2006]
Àcid quinurènic	Antiepilèptic	Rata	↓	ND	ND	ND	[Olah et al., 2013]
Àcid valproic	Antiepilèptic	Gat, rata	↔	↓	+	+	[Ayata et al., 2006; Bogdanov et al., 2010; Hoffmann et al., 2011]
Gabapentina	Antiepilèptic	Rata	↓	ND	+	+	[Hoffmann et al., 2010]
Lamotrigina	Antiepilèptic	Rata	ND	↓	+/-	+/-	[Bogdanov et al., 2010]
Oxcarbacepina	Antiepilèptic	Rata	↔	↔	-	-	[Hoffmann et al., 2011]
Tonabersat	Antiepilèptic	Gat, rata	↓	ND	+/-	+/-	[Read et al., 2000; Smith et al., 2000; Bradley et al., 2001; Read et al., 2001]
Topiramat	Antiepilèptic	Gat, rata	↔/↓	↓	+	+	[Akerman and Goadsby, 2005; Ayata et al., 2006]
DL-propranolol	β-bloquejant	Rata	↔	↓	+	+	[Ayata et al., 2006]
Metoprolol	β-bloquejant	Gat	↔	ND	-	-	[Kaube and Goadsby, 1994]
Flunaricina	Bloquejant dels canals de calci	Rata	↔/↓	ND	+	+	[Wauquier et al., 1985; Reid et al., 1988]
Riboflavina	Vitamina B2	Rata	↔	↓	+/-	+/-	[Bogdanov et al., 2010]

Taula 9. Fàrmacs usats per determinar l'efecte sobre la depressió cortical propagant. ↔: no hi ha canvi; ↑: augmenta; ↓: disminueix; +: tractament eficaç; -: tractament no eficaç; ND: no determinat.

També hi ha treballs on s'utilitzen ratolins *knock-in* o genomodificats als quals se'ls indueix la DCP. En estudis on s'utilitzen ratolins *knock-in* amb les mutacions p.R192Q o p.S218L en el gen *CACNA1A* (causant de la MH de tipus 1), s'ha demostrat que aquestes mutacions augmenten la susceptibilitat a desenvolupar DCPs, ja que disminueixen el llindar d'inducció de la DCP i augmenten la freqüència i l'amplitud de les DCPs (van den Maagdenberg et al., 2004; Eikermann-Haerter et al., 2009; van den Maagdenberg et al., 2010; Eikermann-Haerter et al., 2011). En l'únic estudi on s'utilitzen ratolins amb mutacions al gen *ATP1A2* (causant de la MH de tipus 2), s'ha demostrat que la mutació p.W887R en aquest gen també facilita la inducció i la propagació de la DCP (Leo et al., 2011).

G. TRACTAMENT

Existeixen dos tipus de tractament per combatre la migranya: el tractament agut, encarregat de pal·liar els efectes i la durada de la crisi migranyosa, i el tractament preventiu, encarregat de disminuir la freqüència, la durada i la severitat de les crisis.

Abans d'establir el tractament per a cada pacien, és important realitzar un diagnòstic acurat tenint en compte la severitat i la freqüència de les crisis, els símptomes associats, la comorbiditat amb altres malalties i la resposta prèvia a tractaments semblants. També és important determinar l'efecte del tractament i tenir en compte si existeix risc d'un consum excessiu del tractament agut, ja que pot induir la cronificació de la migranya i/o empitjorar el dolor, i si existeixen efectes secundaris importants.

i. Tractament agut

El tractament agut té com a objectiu aturar una crisi migranyosa una vegada ja ha començat o bé pal·liar els símptomes provocats per aquesta. Normalment, com abans es comenci aquest tractament, més efectiu serà; sobretot quan el dolor encara és moderat. Aquest tipus de tractament es recomana per a cadascun dels episodis, sempre i quan no es superin els 10-15 dies de medicació al mes. Per sobre d'aquesta freqüència, enlloc d'un tractament agut es recomanaria un tractament preventiu.

Dins del tractament agut existeixen fàrmacs que actuen específicament en el desenvolupament de la crisi migranyosa, anomenats fàrmacs específics, i d'altres que actuen controlant tant el dolor de la migranya com el dolor provocat per d'altres malalties, anomenats fàrmacs no específics.

Dins els fàrmacs específics per la migranya, els més efectius que existeixen actualment són els agonistes selectius dels receptors de la serotonina: els triptans. Els efectes dels triptans es basen en l'acció dels receptors sobre els quals actuen, concretament els receptors de serotonina de tipus 1B i 1D. Aquests es localitzen a les terminals presinàptiques de les neurones sensibles perifèriques del trigemin i actuen per una banda constrenyent les artèries de les meninges i, per altra banda, inhibint la transmissió nociceptiva (Villalon et al., 2003; Silberstein, 2004).

Dins els fàrmacs no específics utilitzats per tractar la crisi migranyosa, trobem els analgèsics (poden ser simples, combinats amb cafeïna o antiinflamatoris no esteroïdals, AINEs) i els antiemètics. Els analgèsics simples més utilitzats són el metamizol magnèsic i el paracetamol, tot i que habitualment s'utilitzen més els analgèsics combinats amb cafeïna. Els AINEs més utilitzats són l'àcid acetilsalicílic, el naproxè, l'ibuprofè, el diclofenat sòdic i el dexketoprofè. Els antiemètics es recomanen en el cas de que la simptomatologia inclogui nàusees i/o vòmits.

ii. Tractament preventiu

El tractament preventiu, o profilàctic, té com a objectiu disminuir tant la freqüència de les crisis migranyoses, com la durada i la severitat d'aquestes; així s'aconsegueix disminuir l'ús d'analgèsics i millorar la qualitat de vida del pacien migranyós. Aquest tractament s'aconsella a partir d'una freqüència de 3 crisis de migranya al mes, tot i que existeixen altres indicacions que també es tenen en compte a l'hora de recomanar l'inici del tractament preventiu, com per exemple les crisis de migranya prolongades i la intolerància i/o ineficàcia del tractament agut.

Existeixen diferents tipus de tractaments farmacològics preventius essent els més importants els β -bloquejants, els antidepressius, els bloquejants dels canals de calci, la onabotulinumtoxinA (toxina botulínica) i els antiepilèptics.

També cal considerar que determinades pautes en l'estil de vida del pacient poden tenir un efecte profilàctic en la migranya. Com per exemple, tenir un ritme de vida regular, establint rutines i horaris regulars, i sense estrès i realitzar activitats esportives aeròbiques moderades amb freqüència.

Els β -bloquejants actuen de forma central. La seva activitat es basa en la inhibició dels receptors β de la via adrenèrgica i la interacció amb els receptors de la serotonina. Els receptors β es troben en les cèl·lules del sistema nerviós simpàtic i estan involucrats en la transmissió de les senyals relacionades amb l'estrès. Els β -bloquejants utilitzats com a preventius de migranya són aquells que no són cardioselectius, com el propranolol, el nadolol i el nebivolol (Silberstein, 2011).

L'ús dels antidepressius com a profilàctics de la migranya es basa en la hipòtesi que en la migranya hi ha una disfunció de disponibilitat central de serotonina (Galletti et al., 2009). L'antidepressiu més utilitzat en la profilaxi de la migranya és l'amitriptilina (Galletti et al., 2009); tot i que també poden utilitzar-se d'altres que actuen en els sistemes noradrenèrgics i dopaminèrgics.

El mecanisme d'acció dels bloquejants dels canals de calci com a preventius de la migranya no està clar. El seu ús es va iniciar per la seva acció en la prevenció de la hipòxia neuronal, en la vasoconstricció i en la inhibició de la formació de prostaglandines. El més utilitzat és la flunaricina (Galletti et al., 2009; Moskowitz and Buzzi, 2011).

La onabotulinumtoxinA ha estat aprovada recentment com a tractament preventiu en pacients que no responen als tractaments clàssics i que han estat diagnosticats amb migranya crònica, és a dir, que presenten més de 15 dies de dolor migranyós al mes. El seu efecte ha estat demostrat en alguns assajos clínics, tot i que el seu mecanisme d'acció encara no és conegut.

Alguns fàrmacs antiepilèptics també són efectius en la profilaxi de la migranya. L'epilèpsia i la migranya comparteixen diversos mecanismes patogènics, com per exemple la hiperexcitabilitat cortical i el desequilibri entre la inhibició GABAèrgica i la transmissió glutamatèrgica (Galletti

et al., 2009; Vikelis and Rapoport, 2010). Els antiepilèptics utilitzats com a preventius de migranya són l'àcid valproic, el topiramat, la pregabalina i la gabapentina. A continuació es descriuen amb més detall les característiques de l'àcid valproic i del topiramat.

L'àcid valproic

L'àcid valproic, també conegut com a valproat, valproat sòdic o àcid 2-propilpentanoic, és un àcid gras que s'utilitza des de fa temps pel tractament de l'epilèpsia i del trastorn bipolar. Més recentment, s'ha començat a utilitzar per tractar la depressió clínica major, l'esquizofrènia i la migranya (Boyadjieva and Varadinova, 2012).

Diferents estudis han demostrat que l'àcid valproic és un agent inhibidor de la histona deacetilasa. Aquests enzims actuen regulant negativament l'expressió gènica. Així, gràcies a la inhibició d'aquests enzims, es produeix un increment en l'acetilació de les histones que acaba resultant en un increment de l'expressió gènica (Ookubo et al., 2013). També s'ha vist que l'àcid valproic facilita la desmetilació de l'ADN degut a la interrelació que existeix entre l'acetilació de la cromatina i la metilació de l'ADN (Milutinovic et al., 2007).

Tot i que es desconeixen els mecanismes d'acció concrets que fan que l'àcid valproic sigui un fàrmac preventiu de la migranya, s'ha demostrat que en models animals té un paper inhibidor en la freqüència, la progressió i la intensitat de la DCP quan s'administra de forma crònica (Ayata et al., 2006).

El topiramat

El topiramat és un derivat sulfamat del monosacàrid D-fructosa. Inicialment es va sintetitzar com a part d'un projecte orientat a la cerca d'anàlegs estructurals de la fructosa capaços de bloquejar la gluconeogènesi. La seva estructura química, semblant al fàrmac antiürètic i anticonvulsiu acetazolamida, va fer que es provés el seu efecte com a fàrmac antiepilèptic (Shank et al., 2000). Des de llavors s'ha utilitzat com a tal, però més recentment s'ha començat a prescriure com a agent preventiu de la migranya.

El topiramat també és un agent inhibidor de la histona de-acetilasa (Eyal et al., 2004) amb efectes demostrats sobre l'expressió gènica (Liang et al., 2006).

Igual que l'àcid valproic, es desconeixen els mecanismes que fan que el topiramat sigui un bon fàrmac preventiu de la migranya. Tot i que també s'ha descrit el seu paper com a inhibidor de la DCP (Ayata et al., 2006).

3. GENÈTICA DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS

A. LES MALALTIES MONOGÈNIQUES I LES MALALTIES GENÈTIQUES COMPLEXES

Les malalties genètiques es poden classificar en funció del model d'herència que presenten i del nombre de factors que hi estan implicats. Mitjançant aquesta classificació podem diferenciar entre malalties genètiques simples o monogèniques i malalties genètiques complexes.

Les malalties genètiques simples o monogèniques són malalties que es transmeten seguint les lleis genètiques Mendelianes. El seu origen rau en l'efecte d'un únic gen. En la majoria de malalties monogèniques, les variants genètiques causants d'aquestes són variants perjudicials que impliquen una pèrdua funcional de la proteïna que codifiquen, per això romanen com a variants rares degut a la pressió negativa exercida per la selecció evolutiva. Els trastorns neurològics paroxístics pediàtrics que hem descrit en els apartats anteriors i la migranya hemiplègica són exemples de malalties monogèniques.

Les malalties genètiques complexes són malalties causades per la combinació de múltiples factors genètics i ambientals. Les variants genètiques causants d'aquestes malalties normalment són variants que presenten un efecte menys perjudicial que les que originen les malalties monogèniques. La migranya és un clar exemple de malaltia genètica complexa.

Les tècniques utilitzades per a l'estudi d'ambdós tipus de malalties han evolucionat molt en els darrers anys. Tot i que inicialment es feien servir tècniques comunes per a trobar les variants genètiques causants tant de les malalties monogèniques com de les malalties genètiques complexes, actualment s'utilitzen tècniques específiques per a cada tipus.

B. TÈCNiques PER A L'ESTUDI GENÈTIC DE LES MALALTIES MONOGÈNIQUES

Les tècniques utilitzades per a l'estudi genètic de les malalties monogèniques tenen com a objectiu trobar una única variant genètica la qual és la causa de la malaltia. Tenint en compte que són malalties Mendelianes, l'herència d'aquesta variant serà simple. Per tant, en una mateixa família on visquin individus afectes i sans, si parlem d'herència dominant aquesta variant serà compartida només pels individus afectes; si parlem d'herència recessiva aquesta variant es trobarà en homozigosi en els individus afectes, en heterozigosi en els individus portadors sans i no es trobarà en els individus no portadors sans; i si parlem d'herència lligada al sexe els homes afectes tindran una còpia d'aquesta variant, les dones afectes en tindran dues i les dones portadores sanes només en tindran una.

i. Estudis de lligament genètic en famílies

Una de les aproximacions que s'han utilitzat més a l'hora de determinar la causa genètica d'una malaltia monogènica són els estudis de lligament genètic en famílies. Els estudis de lligament tenen com a objectiu identificar la regió cromosòmica que probablement conté el gen responsable de la malaltia, mitjançant la genotipació de múltiples marcadors genètics distribuïts al llarg de tot el genoma en famílies amb individus afectes.

Aquest mètode es basa en el fet que *loci* físicament propers normalment no recombinen entre ells, per tant, determinats marcadors polimòrfics co-segrogen amb el gen causant de la malaltia en la transmissió de pares a fills. El lligament d'una regió cromosòmica amb la malaltia es determina en funció del valor de *LOD score* obtingut. El *LOD score* és

una mesura que s'obté tenint en compte la probabilitat de recombinació meiòtica entre dos *loci*, el marcador i el causant de la malaltia; valors de *LOD score* superiors a 3 indiquen la presència de lligament genètic i valors inferiors a -2 indiquen l'absència de lligament genètic.

Existeixen dos mètodes principals per a analitzar el lligament genètic: el paramètric, en el qual cal assumir un determinat model d'herència, i el no paramètric, en el qual no s'assumeix cap model d'herència concret.

Les regions cromosòmiques que presenten lligament genètic es consideren com a regions candidates d'incloure el gen causant de la malaltia. Per tant, un cop identificada la regió lligada a la malaltia, el següent pas consisteix en seqüenciar els gens candidats inclosos dins d'aquesta regió per determinar si un d'ells conté la variant patogènica que expliqui la malaltia.

ii. Seqüenciació de gens candidats

Una altra aproximació per a determinar la base genètica d'una malaltia monogènica consisteix en seqüenciar els gens candidats de la malaltia. El primer pas, doncs, requereix determinar els gens candidats a ser els causants de la malaltia, per exemple, realitzant un estudi de lligament genètic. Seguidament es seqüencien els gens candidats escollits, és a dir, aquells gens que degut a la seva funció podrien estar relacionats amb la malaltia, amb l'objectiu de localitzar variants genètiques patogèniques que puguin ser les causants de la malaltia.

iii. Seqüenciació de l'exoma

Degut a l'evolució de les tecnologies de seqüenciació genètica, les metodologies emprades a l'hora de determinar el gen causant d'una malaltia han millorat molt en els darrers anys. La seqüenciació de gens candidats implica un coneixement previ de la funció del gen i de la fisiopatologia de la malaltia en estudi. Per això, la seqüenciació de gens candidats no és sempre possible i, a més a més, sovint existeixen varis gens candidats per a una determinada malaltia. Darrerament s'ha començat a utilitzar la seqüenciació a gran escala de tot el genoma, de tot l'exoma

o bé de les diferents regions d'interès (Pittman and Hardy, 2013). La seqüenciació a gran escala té una millor relació cost/temps/resultat que la seqüenciació clàssica i que els estudis de lligament i permet analitzar genèticament una malaltia sense la necessitat d'haver de partir d'una hipòtesi prèvia.

La seqüenciació de l'exoma consisteix en seqüenciar totes les regions codificants del genoma per tal d'identificar possibles mutacions causants de la malaltia estudiada. Existeixen dues aproximacions diferents per a determinar el gen causant d'una malaltia a partir de la seqüenciació de l'exoma. Una aproximació es basa en l'anàlisi en famílies, en la qual es seqüencien individus afectes i individus sans d'una mateixa família i s'escullen com a gens candidats aquells que presenten variants només en els individus afectes, en el cas d'una herència dominant, o aquells que presenten variants en homozigosi en els individus afectes i en heterozigosi en els individus sans, en el cas d'una herència recessiva (Ku et al., 2013). L'altra aproximació es basa en analitzar varis pacients afectats per la mateixa malaltia que no estiguin emparentats entre ells, en aquest cas es consideren com a candidats aquells gens que presenten variants patogèniques en més d'un dels individus seqüenciats.

La seqüenciació de l'exoma s'ha anat imposant davant l'estudi de lligament genètic i la seqüenciació de gens candidats perquè implica una disminució en el cost econòmic i en el temps requerit per dur-la a terme.

C. TÈCNiques PER A L'ESTUDI GENÈTIC DE LES MALALTIES GENÈTIQUES COMPLEXES

Les tècniques utilitzades per a l'estudi genètic de les malalties genètiques complexes tenen com a objectiu trobar les variants genètiques que causen una malaltia o bé que confereixen susceptibilitat a patir-la. La naturalesa complexa de l'herència d'aquestes malalties en dificulta la seva anàlisi. En aquest cas no parlem de l'associació simple entre una variant genètica i una malaltia, sinó que parlem de l'acció de diferents variants genètiques i de diferents factors ambientals. Per tant, tot i que les malalties genètiques complexes es van començar a estudiar mitjançant

les mateixes tècniques que les malalties monogèniques, els avenços tecnològics han permès desenvolupar noves tècniques i noves metodologies estadístiques enfocades a l'estudi de les malalties genètiques complexes.

i. Estudis de lligament genètic en famílies

L'estudi de lligament genètic en famílies també s'ha utilitzat per a cercar la causa genètica de les malalties genètiques complexes. Tot i ser la mateixa tècnica utilitzada en l'estudi de les malalties monogèniques, la diferència rau en l'anàlisi estadística.

En el cas de les malalties genètiques complexes, el mètode més adequat és el mètode no paramètric, ja que en aquests casos no hi ha un model d'herència clar.

ii. Seqüenciació de gens candidats

Tot i que la determinació de gens candidats en les malalties genètiques complexes és més difícil que en les malalties monogèniques, també és una tècnica utilitzada. Tot i que el futur immediat sembla que portarà a un canvi d'estratègia basat en la seqüenciació del genoma complet degut a l'abaratiment d'aquesta tècnica.

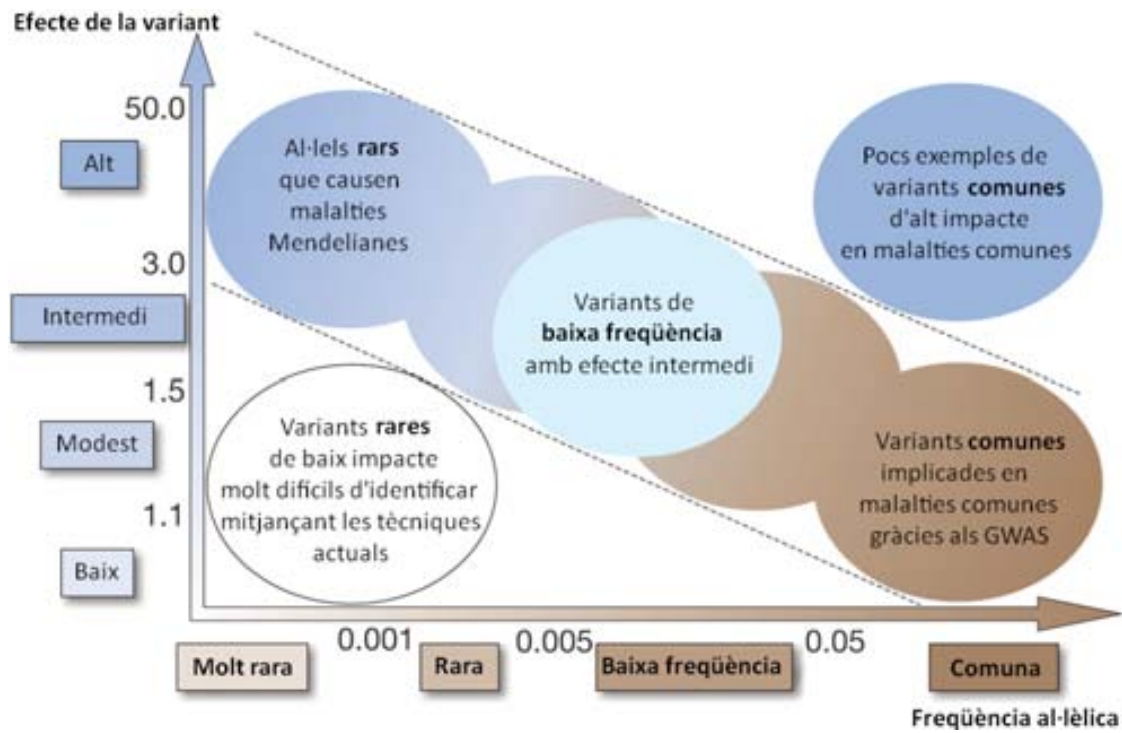


Figura 7. Relació entre malalties genètiques rares o comunes i la freqüència i l'efecte dels al·lels causants. Figura adaptada de (McCarthy et al., 2008).

iii. Estudis d'associació a gens candidats

Els estudis d'associació genètica es basen en determinar si certes variants genètiques es troben associades a la malaltia estudiada mitjançant la comparació d'una mostra de població afectada amb una mostra de població control.

Una estratègia per a dur a terme aquest tipus d'estudis consisteix en realitzar una preselecció de gens candidats que podrien estar associats a la malaltia i seqüenciar els polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) representatius d'aquests gens. Així, l'associació d'un d'aquests SNPs amb la malaltia seria possiblement indicatiu de l'existència d'una relació entre el gen i la malaltia.

iv. Estudis d'associació a nivell genòmic

Una altra estratègia per a dur a terme els estudis d'associació genètica són els estudis d'associació genètica a nivell genòmic (GWAS). A diferència dels estudis d'associació en gens candidats, els GWAS no parteixen de cap hipòtesi prèvia i es basen en trobar variants genètiques, les quals es troben repartides més o menys homogèniament al llarg de tot el genoma, que puguin estar associades a la malaltia en estudi.

Les variants genètiques seleccionades per ser analitzades en un GWAS són variants comunes, que es troben en freqüències altes a la població, i que majoritàriament es localitzen fora de les regions codificants, ja que aquestes només comprenen de l'ordre d'un 1% del genoma. Els GWAS es basen en la hipòtesi que les malalties genètiques comunes es deuen a variants comunes, les quals tenen un efecte fenotípic baix (Manolio et al., 2009); a diferència de les malalties Mendelianes, les quals es deuen a variants rares que tenen un efecte gran. A la figura 7 es representa un gràfic amb l'esquematització de la relació entre malalties Mendelianes i variants rares i malalties complexes i variants comunes.

Un punt metodològic important i sovint limitant dels GWAS és que, igual que els estudis d'associació en gens candidats, requereixen la comparació entre una mostra de població afectada i una mostra de població control, però en aquest cas, degut al gran nombre de variants analitzades en un mateix estudi, es requereix una mida poblacional molt gran per tal de poder trobar resultats estadísticament significatius.

Les meta-anàlisis són un tipus de mètode estadístic que permet analitzar dades provinents de poblacions o cohorts independents. En aquests casos, s'analitza el nivell d'heterogeneïtat de cadascuna de les variants estudiades en el conjunt de les poblacions. En les meta-anàlisis es consideren dos models diferents, d'efectes fixos o aleatoris, en funció de si es detecta homogeneïtat o heterogeneïtat, respectivament. Aquest tipus d'estratègia es pot realitzar tant considerant variants en gens candidats com en GWAS.

v. *Exome chip*: estudis d'associació usant variants rares i funcionals

A part dels GWAS, més recentment s'ha desenvolupat una altra aproximació genètica per tal de determinar el gen associat a una malaltia genètica complexa. Es tracta de la tecnologia de l'*Exome chip*, un array focalitzat en seqüenciar més de 200.000 variants codificants rares o de baixa freqüència (Grove et al., 2013). Metodològicament es tracta de la mateixa tècnica que el GWAS, ja que també consisteix en realitzar un estudi d'associació a nivell genòmic. La diferència es basa en el tipus de variants analitzades: en el GWAS són variants freqüents i majoritàriament no codificants i en el *Exome chip* són variants rares i codificants.

L'*exome chip* s'està començant a utilitzar degut als resultats poc conclouents obtinguts mitjançant els GWAS. Igual que en aquests, es requereix una mida poblacional molt gran, no només per poder obtenir resultats estadísticament significatius, sinó també perquè les variants analitzades es troben en freqüències molt baixes, per tant, cal una mida mostral gran per poder-les-hi trobar representades.

D. ESTUDIS GENÈTICS DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS PEDIÀTRICS

i. Torticoli paroxístic benigne del lactant

El torticoli paroxístic benigne del lactant (TPBL) és un trastorn que està relacionat amb la migranya. De fet, està inclòs dins el grup de "Síndromes episòdics probablement associats a la migranya" en la ICHD-III β . Per això, els estudis genètics del TPBL s'han basat en la seqüenciació del gen *CACNA1A*, el qual codifica la subunitat α del canal de calci neuronal i està involucrat en l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic i ha estat associat, entre d'altres, a les síndromes periòdiques de la infància. Aquestes síndromes normalment es consideren com a manifestacions pediàtriques de la migranya comuna, també anomenades precursors o equivalents de la migranya.

La seqüenciació del gen *CACNA1A* en pacients de TPBL ha permès la descripció de 3 mutacions en 3 casos no emparentats (Giffin et al., 2002; Cuenca-Leon et al., 2008; Roubertie et al., 2008). Dues de les mutacions descrites són mutacions sense sentit i l'altra és de canvi de sentit. La primera, la p.Tyr1854*, es va trobar en un pacient de TPBL que va començar amb les crisis als 6 mesos d'edat. Aquestes consistien en un torticoli del cap cap a l'esquerra durant 15-30 minuts, seguit de vòmits i inestabilitat motora i que duraven entre 1 i 3 dies. El pacient pertanyia a una família amb individus afectes de MH o EA2 portadors de la mateixa mutació (Giffin et al., 2002). La segona mutació, la p.Tyr1245Cys, va ser descrita pel nostre grup en un pacient de TPBL que va evolucionar primer en vertigen paroxístic benigne i posteriorment en MH (Serra et al., 2009). La tercera mutació descrita, la p.Gln736*, es va trobar en un pacient de TPBL que presentava crisis des dels 16 mesos que començaven amb una inclinació del cap, anaven acompanyades d'inestabilitat, gemes, suor i sovint vòmits i duraven des d'una fins a varies hores. Aquest pacient pertanyia a una família amb individus afectes de desviació de mirada cap amunt paroxística i EA2 (Roubertie et al., 2008). És interessant remarcar que en tots els casos descrits les crisis de TPBL acabaven desapareixent o bé evolucionant cap a un altre tipus de paroxismes neurològics amb el pas dels anys.

ii. Hemiplegia alternant de la infància

L'hemiplegia alternant de la infància (HAI) és una malaltia genètica rara de la qual fins fa poc no se'n coneixia el gen causant, el gen *ATP1A3*, el qual codifica la subunitat α_3 de la bomba ATPasa Na^+/K^+ expressada sobretot a neurones. Estudis previs a la troballa d'aquest, els quals es van basar en la seqüenciació de gens candidats, van relacionar la HAI amb mutacions en diferents canals iònics, entre ells el gen *CACNA1A*. Concretament, es va trobar la mutació *de novo* p.Val1696Phe en dos bessons monozigòtics que presentaven un fenotip complex que incloïa hemiplegia alternant, atàxia, epilèpsia, crisis migranyoses i retard mental (de Vries et al., 2008). En aquest estudi, els autors proposen que ambdós pacients presenten una HAI atípica, la qual la defineixen com un fenotip intermedi entre la HAI i la MH. D'una banda, perquè desenvolupen els trets característics de la HAI, com són les crisis d'hemiplegia alternant, el retard mental i en el desenvolupament, els moviments coreics, l'estrabisme i l'atàxia crònica. D'altra banda, però, els símptomes s'inicien després dels 18 mesos de vida, es descriuen també crisis migranyoses, símptomes pertanyents a l'aura i dormir no té un efecte beneficiós en les crisis; trets que lligarien aquest fenotip amb la MH. La HAI també ha estat ocasionalment relacionada amb mutacions en els gens *ATP1A2* (Bassi et al., 2004), *SLC2A1* (Rotstein et al., 2009) i *SLC1A3* (Jen et al., 2005), tot i que sempre en pacients amb fenotips intermedis entre l'hemiplegia alternant de la infància i altres trastorns paroxístics com la migranya hemiplègica o el síndrome de la deficiència del transportador de glucosa. Existeixen varis estudis posteriors basats en la seqüenciació d'aquests gens candidats que no han trobat mutacions en diferents cohorts de pacients de HAI. Per això, en els estudis genètics caldria diferenciar entre pacients típics de HAI i pacients atípics o de fenotip intermedi entre la HAI i un altre trastorn.

La seqüenciació de l'exoma ha permès identificar el gen causant de la majoria de casos de la HAI. La seqüenciació de l'exoma en 16 trios, els quals inclouen l'individu proband i els progenitors, va permetre identificar el gen *ATP1A3* com a causant de la malaltia en aproximadament un 80% dels casos (Heinzen et al., 2012; Rosewich et al., 2012; Ishii et al., 2013), fet que s'ha pogut corroborar en cohorts de pacients analitzades a posteriori (Hoei-Hansen et al.,

2013). Els resultats negatius en aproximadament un 20% dels pacients de HAI podrien indicar que aquesta és una malaltia d'origen genètic heterogeni.

iii. Discinèsia paroxística cinesigènica

La base genètica de la discinèsia paroxística cinesigènica (DPC) va començar a estudiar-se mitjançant estudis de lligament genètic en famílies amb individus afectes de DPC. Aquests estudis van permetre la identificació de varis *loci* lligats a la DPC, tots ells propers a la regió centromèrica del cromosoma 16 (Tomita et al., 1999; Bennett et al., 2000; Swoboda et al., 2000; Cuenca-Leon et al., 2002; Lee et al., 2012). La regions identificades inclouen molts gens que, per la funció de la proteïna que codificaven, eren possibles candidats de causar la malaltia.

Més endavant, la seqüenciació de l'exoma en 3 cohorts independents de pacients xinesos amb DPC (Chen et al., 2011; Wang et al., 2011; Li et al., 2012) va permetre identificar el gen *PRRT2* com a causant de la malaltia. Aquest gen, de funció encara desconeguda, codifica per una proteïna transmembranal que conté una regió rica en prolines a l'extrem N-terminal. Des de la identificació d'aquest gen, s'han publicat desenes d'estudis genètics en diferents cohorts que han ampliat l'espectre fenotípic associat a les més de 30 mutacions trobades en aquest gen. Entre els diferents fenotips associats a mutacions al gen *PRRT2* hi trobem les convulsions infantils i coreoatetosi (ICCA), les convulsions familiars benignes del lactant (BFIS) i la MH (Silveira-Moriyama et al., 2013).

Les mutacions trobades en el gen *PRRT2* es localitzen exclusivament en 2 dels 4 exons que conté el gen. Dins l'exó 2 hi trobem un *hotspot* que representa aproximadament el 60% dels casos de mutacions descrits en la literatura: la mutació c.649dupC (p.R217Pfs*8). Aquesta mutació s'ha trobat en totes les poblacions estudiades, en tots els fenotips descrits i també en pacients esporàdics que presentaven la mutació *de novo* (Pringsheim et al., 2010). Probablement, aquest locus és un *hotspot* degut a que es troba en una regió on hi ha 9 citosines seguides, fet que podria induir una major freqüència d'error de l'enzim ADN polimerasa. A part de la duplicació c.649dupC, en la mateixa posició també s'ha

descriu la deleció c.649delC, tot i que en una menor proporció de casos, la qual també provoca l'aparició d'un codó STOP prematur en la seqüència proteica (p.R217Efs*12).

iv. Síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1

La síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1 (GLUT1DS) es caracteritza (en la majoria dels casos) per la presència de nivells baixos de glucosa en el líquid cefaloraquídi (hipoglucoorràquia) associats a glucèmia normal o, el que és el mateix, per la constatació d'un quocient líquid cefaloraquídi/plasma de glucosa inferior a 0,4, o d'entre 0,4 i 0,6 en els casos de gravetat intermèdia. Aquesta troballa en les primeres sèries de pacients, així com la comprovació *in vitro* d'una captació eritrocitària deficient de glucosa, va suggerir que la causa del trastorn podia raure en un dèficit en el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica. Per això, es va procedir a la seqüenciació del gen *SLC2A1*, el qual codifica pel transportador de glucosa situat a la barrera hematoencefàlica, en pacients de GLUT1DS (Seidner et al., 1998). En aquest primer estudi es van trobar 2 deleccions grans i 2 mutacions sense sentit en el gen *SLC2A1* en 4 pacients típics de GLUT1DS. Des de llavors s'han descrit més de 40 mutacions diferents que expliquen tant el fenotip clàssic, descrit per De Vivo i col·laboradors l'any 1971, com els fenotips "no clàssics", descrits posteriorment, que inclouen pacients amb retard mental i trastorns del moviment però que no presenten epilèpsia i també pacients amb discinèsia paroxística induïda per l'exercici (Leen et al., 2010).

El ràpid diagnòstic d'aquesta malaltia està associat amb un desenvolupament més lleu de la simptomatologia, incloent el retard mental, gràcies a l'inici del tractament basat en l'ús d'una dieta cetogènica. El primer pas per al diagnòstic de la malaltia és la realització d'una punció lumbar per tal de determinar el nivell de glucosa en líquid cefaloraquídi; en els casos d'hipoglucoorràquia, s'hauria de procedir a la seqüenciació del gen *SLC2A1* per tal de confirmar-ne el diagnòstic.

E. ESTUDIS GENÈTICS DE LES FORMES MONOGÈNIQUES DE MIGRANYA: LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA

La migranya hemiplègica (MH) és un subtipus rar i sever de migranya amb aura que presenta un patró d'herència autosòmica dominant. S'han descrit 4 gens associats a MH: CACNA1A, ATP1A2, SCN1A i, més recentment i amb una menor proporció de casos, PRRT2. Tot i això, la proporció de pacients amb MH amb resultats genètics positius és encara molt baixa. Concretament, dels pacients amb MH familiar, aproximadament un 40% presenten mutació en un dels 4 gens citats (Riant et al., 2005) i dels pacients amb MH esporàdica, entre un 7 i un 16% (de Vries et al., 2007). Dels 4 gens associats a MH, el gen CACNA1A i ATP1A2 són els que presenten una major proporció de casos, seguit dels gens PRRT2 i SCN1A.

En el cas del gen PRRT2 no està clar quin seria el mecanisme que el lligaria amb la fisiopatologia de la MH, ja que encara queda molt per avançar en el coneixement sobre els diferents aspectes de la proteïna PRRT2. En relació als gens CACNA1A, ATP1A2 i SCN1A, els 3 gens codifiquen per canals iònics involucrats en la transmissió glutamatèrgica. La identificació d'aquests 3 gens ha estat de gran ajuda a

l'hora de poder confirmar genèticament el diagnòstic clínic en els pacients amb MH i, a més a més, ha donat informació sobre les bases moleculars de la migranya, revelant la importància que té la neurotransmissió glutamatèrgica en aquesta malaltia (Eising et al., 2013b). A la figura 8 es representa la funció de les 3 proteïnes causants de la MH en una sinapsi glutamatèrgica. La disfunció d'aquests 3 canals implica una major activació de les vies glutamatèrgiques: les mutacions de guany de funció del gen CACNA1A provoquen un augment de l'influx de calci intracel·lular, el qual promou l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic; les mutacions en el gen ATP1A2 provoquen que l'entrada de K⁺ al citoplasma de l'astròcit sigui menor, així la recaptació de glutamat duta a terme pel transportador astrocític de glutamat, el qual requereix aquest K⁺ per actuar, funciona a un ritme més baix; i les mutacions en el gen SCN1A, el qual actua en la generació i la propagació dels potencials d'acció, causen la recuperació accelerada de la inactivació ràpida del canal permetent una freqüència d'activació major (Wessman et al., 2007).

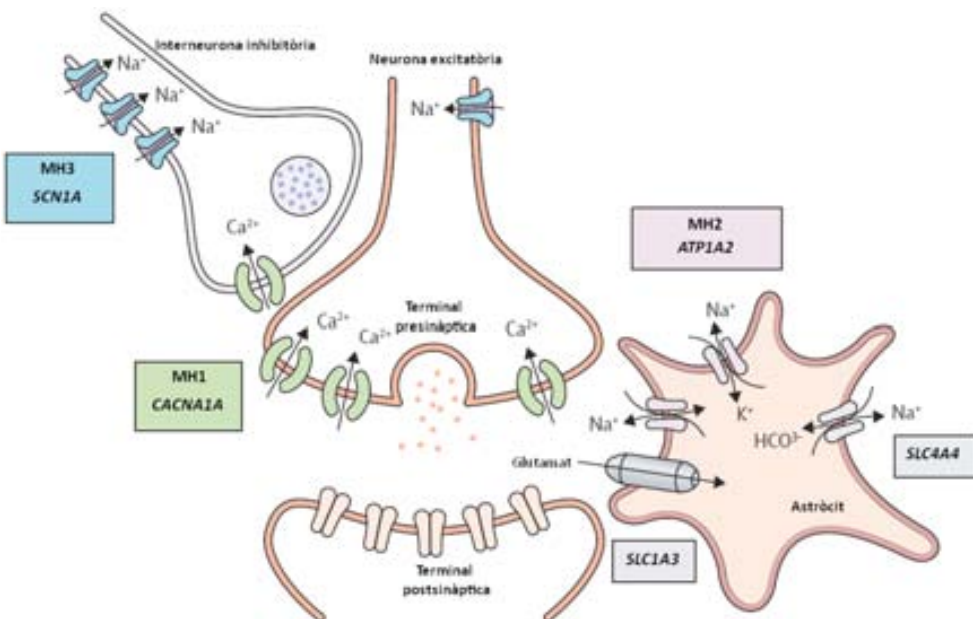


Figura 8. Representació de les proteïnes causants de la migranya hemiplègica de tipus 1, 2 i 3 a la sinapsi glutamatèrgica. Imatge adaptada de (Russell and Ducros, 2011). MH1,2,3: migranya hemiplègica tipus 1, 2 i 3.

i. La migranya hemiplègica i el gen *CACNA1A*

El gen *CACNA1A* va associar-se amb la MH per primera vegada l'any 1996 (Ophoff et al., 1996). En aquest estudi es van seqüenciar els gens candidats inclosos en la regió cromosòmica 19p13, la qual havia estat prèviament relacionada amb MH i EA2 gràcies a diferents estudis de lligament genètic. En aquest primer treball, es van definir 4 mutacions de canvi de sentit en el gen *CACNA1A* associades a MH. Des de llavors, se n'han descrit més de 20 associades a aquest fenotip.

En els darrers anys s'han dut a terme diferents estudis funcionals de les mutacions en el gen *CACNA1A* que provoquen MH. Els estudis funcionals realitzats mitjançant *patch clamp* han determinat que el mecanisme d'acció principal d'aquestes mutacions és un increment de la probabilitat d'obertura del canal, de manera que es provoca un augment en l'entrada de ions calci a la cèl·lula incrementant el nivell de neurotransmissió excitatòria. Així doncs, aquestes mutacions s'anomenen de guany de funció (van den Maagdenberg et al., 2010).

També s'han usat models animals per a l'estudi funcional de les mutacions al gen *CACNA1A*. Concretament s'han estudiat les mutacions p.Arg192Gln i p.Ser218Leu en models de ratolins *knock-in*. Aquests estudis han determinat que ambdues mutacions disminueixen el lllindar d'inducció de la DCP i augmenten la seva velocitat de propagació en comparació amb els ratolins *wild-type* (Eikermann-Haerter et al., 2009). També s'ha demostrat que els ratolins del sexe femení portadors de qualsevol d'ambdues mutacions presenten una susceptibilitat significativament major davant la DCP en comparació amb els del sexe masculí; diferència que és eliminada mitjançant l'ovariectomia. Aquests resultats indiquen l'efecte que tenen les hormones sexuals en la susceptibilitat a patir migranya (Eikermann-Haerter and Ayata, 2010).

ii. La migranya hemiplègica i el gen *ATP1A2*

El gen *ATP1A2* va associar-se amb la MH per primera vegada l'any 2003, gràcies a la seqüenciació dels gens candidats inclosos en la regió cromosòmica que havia estat prèviament

l·ligada amb la malaltia (De Fusco et al., 2003). En aquest primer estudi es van trobar dues mutacions puntuals diferents en el gen *ATP1A2* en pacients de MH pertanyents a dues famílies diferents. L'anàlisi funcional de les mutacions va permetre concloure que ambdues provocaven una pèrdua de funció de la proteïna. Des de llavors s'han descrit més de 60 mutacions diferents en el gen *ATP1A2* associades a MH que sobretot inclouen mutacions de canvi de sentit i, amb una proporció molt més baixa, mutacions de canvi en la pauta de lectura, mutacions sense sentit i delecions petites (Russell and Ducros, 2011).

iii. La migranya hemiplègica i el gen *SCN1A*

El gen *SCN1A* va associar-se amb la MH l'any 2005 gràcies a la seqüenciació dels gens candidats inclosos a la regió de lligament trobada en tres famílies multigeneracionals de MH (Dichgans et al., 2005). En aquest estudi es va trobar la mutació p.Gln1489Lys en les 3 famílies analitzades.

Des de llavors, només s'han descrit 5 mutacions, totes de canvi de sentit, sempre en casos familiars de MH. En comparació amb les més de 700 mutacions trobades en casos d'epilèpsia, la proporció de mutacions en aquest gen associades a MH és molt baixa. El gen *SCN1A* codifica pel canal de Na⁺ neuronal activat per voltatge i s'expressa sobretot en la membrana plasmàtica de les interneurons inhibidores, jugant un paper indispensable en la iniciació i la propagació dels potencials d'acció. S'han realitzat pocs estudis funcionals de les mutacions en el gen *SCN1A* que causen MH (Cestele et al., 2008), tot i això es creu que el seu paper en la fisiopatologia de la migranya es basa en una recuperació accelerada de la inactivació ràpida del canal permetent una freqüència d'activació major, la qual tindria un paper en l'increment de l'excitabilitat neuronal (Wessman et al., 2007).

iv. La migranya hemiplègica i el gen *PRRT2*

La relació del gen *PRRT2* amb la MH s'ha establert molt recentment. La seqüenciació d'aquest gen en pacients de MH ha permès la identificació de la mutació c.649dupC en 5 famílies que presenten MH i DPC, en una família amb MH i BFIS, en 1 família amb atàxia episòdica i HM, en 3 famílies amb MH i en un cas esporàdic de MH (Cloarec et al., 2012; Dale et al., 2012; Gardiner et al., 2012; Marini et al., 2012; Riant et al., 2012; Castiglioni et al., 2013; Silveira-Moriyama et al., 2013). També s'ha identificat la mutació c.649delC en 3 famílies amb MH (Riant et al., 2012).

Així, s'han descrit mutacions en el gen *PRRT2* només en 7 casos de MH pura. En els altres casos, com que no presenten un fenotip pur, no es pot assegurar que l'efecte de la mutació en el gen *PRRT2* sigui el causant de la MH o bé que hi hagi una segona mutació en un altre gen que provoqui aquesta part del fenotip.

F. ESTUDIS GENÈTICS DE LES FORMES COMUNES DE MIGRANYA

i. Heretabilitat de la migranya

L'heretabilitat d'una malaltia s'estudia clàssicament utilitzant bessons homozigòtics i dizigòtics. D'aquesta manera, es pretén separar la contribució genètica de la contribució ambiental d'un determinat fenotip.

En relació a l'heretabilitat de la migranya, s'han realitzat varis estudis en diferents cohorts de bessons d'on s'ha pogut estimar que l'heretabilitat d'aquesta malaltia es troba entre el 33% i el 77% (Svensson et al., 1999; Mulder et al., 2003; Svensson et al., 2003; Nielsen et al., 2012); la gran diferència existent entre ambdós valors es deu principalment a si l'anàlisi ha estat realitzada en bessons monozigòtics, on l'heretabilitat és major, o en bessons dizigòtics, on l'heretabilitat és menor. Més recentment s'ha fet una metanàlisi on s'analitzaven aquests resultats conjuntament, es va calcular que l'heretabilitat total de la migranya és del 45% (Nielsen et al., 2012). Així, podem dir que aproximadament la meitat del risc de ser migranyós és atribuïble a la genètica.

ii. Estudis de lligament genètic en famílies

Els primers estudis realitzats amb l'objectiu de localitzar l'origen genètic de les formes comunes de migranya es van basar en estudis de lligament genètic en famílies. Tot i que van permetre localitzar diverses regions cromosòmiques que podrien contenir gens de susceptibilitat a patir migranya, en cap cas van permetre la identificació dels gens causants d'aquesta malaltia (de Vries et al., 2009). A la taula 10 es resumeixen els resultats més rellevants dels estudis de lligament genètic realitzats en pacients amb migranya amb i/o sense aura.

LOCUS CROMOSÒMIC	FENOTIP	POBLACIÓ	REFERÈNCIA
1q31	MA, MA/MO	Australiana	(Lea et al., 2002)
4q21	MO	Islandesa	(Bjornsson et al., 2003)
4q24	MA	Finlandesa	(Wessman et al., 2002)
6p12.2-p21.1	MA/MO	Sueca	(Carlsson et al., 2002)
10q22-q23	MA	Finlandesa / australiana	(Anttila et al., 2008)
11q24	MA	Canadenca	(Cader et al., 2003)
14q21.2-q22.3	MO	Italiana	(Soragna et al., 2003)
15q11-q13	MA	Italiana	(Russo et al., 2005)
19p13	MA	Nord-americana	(Jones et al., 2001)+
Xq25-q28	MA/MO	Australiana	(Nyholt et al., 2000)

Taula 10. Resum dels resultats més rellevants obtinguts mitjançant estudis de lligament en formes comunes de migranya.

Cada fila correspon a un estudi de lligament genètic i s'hi indica el locus cromosòmic lligat a la malaltia, el fenotip i l'origen dels pacients usats en l'anàlisi i la referència de cada estudi. Taula adaptada de (de Vries et al., 2009). MA: migranya amb aura; MO: migranya sense aura.

iii. Seqüenciació de gens candidats

Una aproximació diferent que s'ha utilitzat per a determinar la causa genètica de la migranya comuna ha estat la seqüenciació directa dels gens candidats. Els primers estudis basats en aquesta metodologia es van centrar en la seqüenciació dels gens causants de la MH (concretament els gens *CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A*). Aquests, però, no van permetre identificar mutacions en les formes comunes de migranya.

En una publicació recent, els autors van escollir el gen *KCNK18* com a possible gen candidat de la migranya comuna. Aquest gen codifica la proteïna TRESK, un canal de K⁺ de tipus K2P que s'expressa als ganglis espinals i a les neurones del gangli trigemin i té un paper important en l'excitabilitat neuronal. En seqüenciar aquest gen en 110 migranyosos van trobar una possible mutació que segregava amb el fenotip de MA en una família multigeneracional (Lafreniere et al., 2010). La mutació trobada, la p.F139WfsX24, és una mutació truncant que implica la pèrdua de la funcionalitat del canal.

En un article més recent els mateixos autors van trobar una mutació en el mateix gen que també implicava la pèrdua de funció del canal, però en aquest cas la van trobar tant en individus migranyosos com en individus control (Andres-Enguix et al., 2012). Tot i que aquest fet qüestiona la relació causal directa entre les mutacions en el gen *KCNK18* i la migranya, aquest gen continua essent considerat com un candidat a conferir susceptibilitat a patir migranya (Eising et al., 2013b).

A part de la seqüenciació del gen *KCNK18*, recentment s'ha publicat un estudi on s'identifiquen dues famílies on mutacions en el gen *CSNK1D* cosegüen amb la presència de migranya i de la síndrome de l'avenç de la fase del son (Brennan et al., 2013). El gen *CSNK1D* codifica per la isoforma δ de la proteïna caseïna kinasa. Aquesta proteïna és una serina-treonina kinasa que fosforila la proteïna del relotge circadiari Per2 i també altres proteïnes involucrades en la senyalització cerebral (Knippschild et al., 2005). Tot i que la funció d'aquesta proteïna podria estar relacionada amb la patogenicitat de la migranya, mutacions en aquest gen han estat identificades com a causants de la síndrome de l'avenç de la fase del son. Segurament, doncs, en aquestes dues famílies la mutació en el gen *CSNK1D* deu causar aquesta síndrome i una o més variants en altres gens podrien causar o augmentar la susceptibilitat a desenvolupar la migranya.

Aquesta conclusió es veu reforçada pel fet que en una de les dues famílies identificades, trobem un individu amb la mutació que només presenta la síndrome de l'avenç de la fase de la son i un altre individu descrit amb MA que no presenta la mutació.

iv. Estudis d'associació a gens candidats

S'han realitzat nombrosos estudis d'associació a gens candidats en formes comunes de migranya, tant en MA com en MO. Aquests estudis inclouen gens candidats com són el gen *MTHFR* (Lea et al., 2004; Kaunisto et al., 2006; Scher et al., 2006; Schurks et al., 2008; Rubino et al., 2009); gens del sistema dopaminèrgic, com per exemple *DRD2* i *SLC6A3* (Todd et al., 2009); gens del sistema serotoninèrgic, com *HTR2C* (Johnson et al., 2003); gens del sistema del receptor GABA, com *GABRA5* i *GABRB3* (Oswell et al., 2008); gens que codifiquen receptors hormonals, com *ESR1* i *ESR2* (Oterino et al., 2008); gens relacionats amb la inflamació, com *TNFA* i *LTA* (Lee et al., 2007); i d'altres gens, com per exemple diferents transportadors iònics (Nyholt et al., 2008).

Tot i l'existència de nombrosos resultats positius (de Vries et al., 2009), cap d'ells sembla que comporti una associació genètica robusta ni tampoc cap ha estat replicat en d'altres cohorts independents de pacients. Segurament aquest fet es deu a l'existència d'errors metodològics relacionats amb la mida de la mostra, la selecció dels casos i controls, la mala correcció estadística per proves múltiples i/o la incapacitat de replicar els resultats en poblacions independents (Eising et al., 2013b).

v. Estudis d'associació a nivell genòmic

En la cerca dels gens associats a la migranya, s'han realitzat 3 estudis d'associació a nivell genòmic (GWAS) i 3 meta-anàlisis amb dades d'associació a nivell genòmic.

El primer GWAS el van dur a terme diferents grups pertanyents al *International Headache Genetics Consortium* (IHGC) l'any 2010 (Anttila et al., 2010). En aquest estudi, es va analitzar una mostra clínica de 2731 pacients amb migranya amb aura i 10747 controls provinents de 3 pobla-

cions diferents: una finesa, una alemanya i una holandesa. Es va trobar que la variant genètica rs1835740, situada a la regió cromosòmica 8q22.1, confereix susceptibilitat a patir migranya. Aquest resultat va replicar-se en 3202 casos i 40062 controls addicionals, provinents de poblacions daneses, holandeses, islandeses i alemanyes. La variant trobada és una variant intergènica, situada entre dos gens implicats en la homeòstasi del glutamat: el gen *MTDH*, que codifica la metadherina, un regulador del transportador de glutamat *SLC1A2*; i el gen *PGCP*, que codifica la carboxipeptidasa plasmàtica, involucrada en l'acumulació de glutamat en l'espai sinàptic. Mitjançant una anàlisi quantitativa en fibroblasts, es va observar que l'al·lel de la variant associat a migranya correlacionava amb nivells d'expressió més alts del gen *MTDH*.

En una meta-anàlisi de GWAS realitzada l'any 2011, es va analitzar una mostra poblacional formada per 2446 migranyosos (provinents de 6 cohorts diferents) i 8534 controls i es va detectar associació nominal en 32 dels SNPs analitzats (Ligthart et al., 2011). Cap dels SNPs es va poder replicar en ser avaluats en la cohort de replicació.

En un GWAS posterior es va analitzar una mostra poblacional formada per 5122 migranyosos (provinents del *Women's Genome Health Study*) i 18108 controls (Chasman et al., 2011).

En aquest estudi cap dels SNPs analitzats presentava una associació estadísticament significativa a la migranya. Tot i això, 3 dels SNPs que presentaven una associació més alta van ser analitzats en una meta-anàlisi amb 3 poblacions diferents, resultant significativament associats a migranya. Aquests 3 SNPs són el rs2651899, localitzat a la regió cromosòmica 1p36.32, dins el primer intró del gen *PRDM16*; el rs10166942, localitzat a la regió cromosòmica 2q37, molt proper al punt d'inici de transcripció del gen *TRPM8*; i el rs11172113, localitzat a la regió cromosòmica 12q13.3, dins el primer intró del gen *LRP1*. El gen *PRDM16* està relacionat amb el desenvolupament del teixit adipós bru; el gen *TRPM8* codifica per un sensor de fred i del dolor induït pel fred i s'expressa en neurones sensorials i en el gangli espinal; i el gen *LRP1* codifica per un receptor de la família de les lipoproteïnes i interacciona amb receptors

del glutamat (Schurks, 2012). En una meta-anàlisi posterior que incloïa 2523 migranyosos i 38170 controls, es van analitzar els SNPs que presentaven una associació més alta en aquest GWAS. Com a resultats es va trobar que els SNPs localitzats al gens *TRPM8* i *LRP1* estaven significativament associats a migranya (Esserlind et al., 2013).

Més endavant va realitzar-se un altre GWAS amb una mostra clínica formada per 2326 migranyosos sense aura i 4580 controls (Freilinger et al., 2012). Es van escollir SNPs de 12 loci que incloïen 2 o més SNPs associats a migranya amb una $p < 1 \times 10^{-5}$ per a replicar-los en una mostra clínica de 2508 migranyosos sense aura i 2652 controls. Els SNPs rs3790455, localitzat a la regió 1q22 dins el gen *MEF2D*, i rs7640543, localitzat a la regió 3p24, proper al gen *TGFBR2*, van ser convincentment replicats. Mentre que els SNPs rs9349379, localitzat dins el gen *PHACTR1*, i rs6478241, localitzat dins el gen *ASTN2*, suggerien una tendència a la replicació.

A més a més, van replicar els resultats obtinguts en el GWAS anterior, mostrant de nou una associació entre els gens *TRPM8* i *LRP1* i la susceptibilitat a patir migranya.

Recentment s'ha publicat una meta-anàlisi que inclou dades de 29 GWAS. Analitzant un total de 23285 migranyosos i 95425 controls, s'han identificat 12 loci associats amb susceptibilitat a migranya (Anttila et al., 2013). 5 d'aquests loci no s'havien relacionat mai amb la migranya: rs10915437, proper al gen *AJAP1*; rs12134493, proper al gen *TSPAN2*; rs13208321, dins el gen *FHL5*; rs4379368, dins el gen *c7orf10*; i rs10504861, proper al gen *MMP16*.

Els diferents loci que s'han anat trobant associats a migranya, els quals es troben representats a la taula 11, van afegint informació sobre aquesta malaltia. A més a més, reflecteixen la complexitat genètica que es troba, suposadament, rere la migranya.

GEN IMPLICAT	SNP	LOCALITZACIÓ	M/MA /MO	P VALOR (OR)	REFERÈNCIA		
<i>MTDH</i>	rs1835740	Intergènica	MA	1.69×10^{-11} (1.18)	(Anttila et al., 2010)		
<i>PRDM16</i>	rs2651899	Intragènica	M	3.8×10^{-9} (1.11)	(Chasman et al., 2011)		
			M	3.28×10^{-14} (1.09)	(Anttila et al., 2013)		
<i>TRPM8</i>	rs10166942	Intergènica	M	5.5×10^{-12} (0.85)	(Chasman et al., 2011)		
			MO	9.83×10^{-13} (0.78)	(Freilinger et al., 2012)		
			MO	5.97×10^{-9} (0.77)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>LRP1</i>	rs7577262	Intragènica	M	3.27×10^{-13} (0.87)	(Anttila et al., 2013)		
			rs11172113	Intragènica	M	4.3×10^{-9} (0.9)	(Chasman et al., 2011)
					MO	2.97×10^{-8} (0.86)	(Freilinger et al., 2012)
<i>MEF2D</i>	rs2274316	Intragènica	M	2.69×10^{-19} (0.9)	(Anttila et al., 2013)		
			MO	7.06×10^{-11} (1.2)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>TGFBR2</i>	rs7640543	Intergènica	M	3.14×10^{-8} (1.07)	(Anttila et al., 2013)		
			MO	1.17×10^{-9} (1.19)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>PHACTR1</i>	rs6790925	Intergènica	M	2.16×10^{-8} (1.15)	(Anttila et al., 2013)		
			MO	3.2×10^{-8} (0.86)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>ASTN2</i>	rs9349379	Intragènica	M	2.81×10^{-10} (0.86)	(Anttila et al., 2013)		
			MO	3.86×10^{-8} (1.16)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>AJAP1</i>	rs6478241	Intragènica	M	1.04×10^{-9} (1.16)	(Anttila et al., 2013)		
			MO	3.86×10^{-8} (1.16)	(Freilinger et al., 2012)		
<i>AJAP1</i>	rs10915437	Intergènica	M	2.81×10^{-8} (0.86)	(Anttila et al., 2013)		
<i>TSPAN2</i>	rs12134493	Intergènica	M	6.71×10^{-14} (1.14)	(Anttila et al., 2013)		
<i>FHL5</i>	rs13208321	Intragènica	M	2.15×10^{-12} (1.18)	(Anttila et al., 2013)		
<i>c7orf10</i>	rs4379368	Intragènica	M	1.46×10^{-9} (1.11)	(Anttila et al., 2013)		
<i>MMP16</i>	rs10504861	Intergènica	M	1.32×10^{-8} (0.86)	(Anttila et al., 2013)		

Taula 11. Resum dels gens i dels loci associats a migranya mitjançant estudis d'associació a nivell genòmic (GWAS). M: migranya; MA: migranya amb aura; MO: migranya sense aura; OR: de l'anglès, odds ratio.

4. EPIGENÈTICA DELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS

A. EPIGENÈTICA: CONCEPTES CLAU

El terme epigenètica va ser usat per primera vegada l'any 1942 per Conrad Waddington, qui el va definir com “la branca de la biologia que estudia les interaccions causals entre els gens i els seus productes, fet que produeix que es desenvolupi un fenotip concret”. Tot i que la base conceptual és la mateixa, actualment l'epigenètica es refereix a les modificacions o propietats del genoma que no estan implicades en la seqüència de l'ADN, però que són heretables a través de la divisió cel·lular (Portela and Esteller, 2010).

L'estudi de l'epigenètica ha augmentat molt en els darrers anys, amb l'objectiu tant d'explicar el seu funcionament, com d'explicar la seva implicació en malalties com el càncer, la leucèmia i, en el nostre cas, els trastorns neurològics paroxístics. El desenvolupament de noves tècniques per estudiar diferents mecanismes epigenètics està resultant en una evolució cap al coneixement d'aquesta branca. Cal remarcar, però, que a diferència dels estudis genètics en els quals es pot obtenir ADN de qualsevol tipus cel·lular, en el cas dels estudis epigenètics l'obtenció de la mol·lècula en estudi comporta més complicacions. Els canvis epigenètics són específics tant de teixit com de tipus cel·lular i també poden variar al llarg del temps, per exemple segons el moment del desenvolupament de l'individu o en funció de a què estigui exposat l'individu.

Les modificacions epigenètiques poden classificar-se en 4 grups: metilació de l'ADN, modificació de les histones, remodelació dels nucleosomes i acció dels ARNs no codificants.

B. MODIFICACIONS EPIGENÈTIQUES

i. Metilació de l'ADN

La metilació de l'ADN es refereix a la transferència d'un grup metil del donador S-adenosilmetionina (SAM) al nucleòtid citosina de l'ADN (Graff et al., 2011). Aquesta reacció la catalitzen els enzims de la família de les ADN-metiltransferases (DNMTs).

La majoria de la metilació de l'ADN es dona en el context dels dinucleòtids CpG. Aquests acostumen a agrupar-se en regions anomenades illes CpG (CGI), les quals es defineixen com regions de més de 200 parells de bases amb un mínim d'un 50% de guanosines i citosines i amb una ràtio de “dinucleòtids CpG observats/estadísticament esperats” de com a mínim 0.6 (Portela and Esteller, 2010). Les illes CpG no es troben distribuïdes aleatòriament al llarg del genoma, sinó que les trobem típicament en promotors de gens transcripcionalment molt actius, com són els gens *housekeeping* i els gens supressors de tumors (Inbar-Feigenberg et al., 2013).

La metilació de l'ADN és un mecanisme epigenètic que generalment s'associa a la inhibició de l'expressió gènica. Aquesta inhibició pot donar-se mitjançant diferents processos. D'una banda, l'ADN metilat recluta proteïnes que contenen el domini d'unió a grups metil (domini MBD); aquestes recluten complexos que modifiquen les histones i que remodelen la cromatina fent que es produeixi una inhibició de la transcripció gènica (Esteller, 2007).

Per altra banda, l'ADN metilat pot inhibir directament l'expressió gènica impedit que les proteïnes d'unió a l'ADN encarregades d'iniciar la transcripció reconeguin els seus llocs específics d'unió (Kuroda et al., 2009). A més a més, l'ADN no metilat crea una estructura de la cromatina favorable per a l'expressió gènica reclutant factors que s'associen a enzims que metilen histones (Thomson et al., 2010).

Tot i que la metilació de l'ADN generalment s'associa amb la inhibició de l'expressió gènica, troballes recents indiquen que l'efecte de la metilació depèn del context genòmic en el que es doni (Portela and Esteller, 2010; Shenker and Flanagan, 2012; Kulis et al., 2013). Tot i que encara no hi ha moltes evidències, sembla ser que l'efecte de la metilació de l'ADN funcionaria de la següent manera:

- En regions promotores la metilació de l'ADN inhibeix la transcripció gènica mitjançant el reclutament de proteïnes amb dominis MBD que impedeixen la unió dels factors de transcripció.
- En regions repetitives intergèniques la metilació de l'ADN inhibeix l'expressió de seqüències endoparàsites que causen inestabilitat cromosòmica, translocacions i disrupció gènica.
- En regions intragèniques la metilació de l'ADN s'associa amb expressió gènica. Sembla que la metilació intragènica presenta diverses funcions. D'una banda, la metilació intragènica silencia els promotors alternatius existents, fent alhora que es potenciï l'elongació dels transcrits canònics. També es relaciona amb la inhibició de la transcripció dels ARNs antisentit, potenciant indirectament una major transcripció dels gens inhibits per aquests.

A la figura 9 es representa l'efecte de la metilació en funció del context genòmic on es generi.

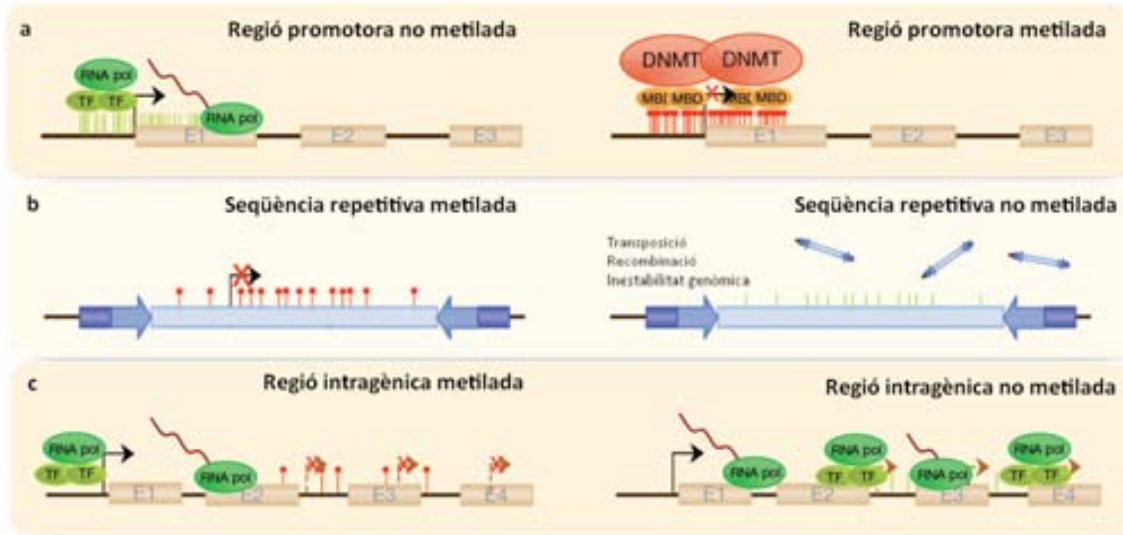


Figura 9. Efecte de la metilació de l'ADN en diferents regions genòmiques. a) Metilació en regions promotores b) Metilació en seqüències repetitives intergèniques c) Metilació en regions intragèniques. *Figura adaptada de (Portela and Esteller, 2010). RNA pol: polimerasa; TF: factor de transcripció; DNMT: ADN metiltransferasa; MBD: proteïna d'unió a grups metil; E 1,2,3,4: exó 1, 2, 3, 4.*

La metilació de l'ADN és un mecanisme que en un principi es pensava que era estable i difícil de modificar; es creia que el patró de metilació que adquirien les cèl·lules durant el desenvolupament de l'individu romania constant al llarg de la vida d'aquest. Contràriament a aquesta idea inicial, s'ha vist que la metilació de l'ADN és un fenomen dinàmic: es produeix tant una metilació com una desmetilació de l'ADN degut a l'efecte de diferents factors externs (Ramchandani et al., 1999).

ii. Modificació de les histones

La cromatina s'estructura en unitats anomenades nucleosomes, les quals estan formades per octàmers d'histones, concretament per 2 unitats de cadascuna de les següents histones: H2A, H2B, H3 i H4. L'ADN s'embolica al voltant dels nucleosomes formant una estructura compacta i inaccessible per a l'accés de la maquinària de transcripció.

Les histones són proteïnes globulars que contenen una cua a l'extrem N-terminal on poden donar-s'hi diferents modificacions postraduccionals, com per exemple l'acetilació i la metilació, que estan involucrades en la regulació de l'expressió gènica. Així, en funció de la histona modificada i del tipus de modificació, l'efecte final serà d'activació o bé d'inhibició de l'expressió gènica (Portela and Esteller, 2010; Inbar-Feigenberg et al., 2013).

iii. Remodelació dels nucleosomes

La presència de nucleosomes inhibeix tant l'inici com l'elongació de la transcripció gènica, ja que aquests impedeixen la unió dels factors de transcripció i també l'avançament de les polimerases al llarg de la cadena d'ADN.

La remodelació dels nucleosomes consisteix en canviar l'estructura de la cromatina mitjançant enzims que requereixen l'ús d'ATP. Aquests enzims faciliten el canvi de posició dels nucleosomes, fent que algunes regions genòmiques quedin accessibles i d'altres quedin emmascarades pels nucleosomes (Graff et al., 2011).

iv. Acció dels ARNs no codificants

Els ARNs no codificants tenen un paper important pel que fa a la regulació epigenètica de l'expressió gènica. Existeixen diferents tipus d'ARNs no codificants, els quals es classifiquen segons la seva mida i funció. En són exemples els ARNs petits d'interferència, els microARNs i els ARNs llargs no codificants.

C. ESTUDIS DE METILACIÓ DE L'ADN EN GENS CANDIDATS

Una de les aproximacions més utilitzades en l'estudi de l'epigenètica és l'estudi de la metilació de l'ADN en gens candidats. Aquests estudis es basen en escollir gens que funcionalment poden estar implicats en la malaltia d'interès i analitzar-ne els patrons de metilació, comparant, per exemple, mostres provinents de pacients amb mostres d'individus control.

Un dels reptes per a determinar l'estat de la metilació de l'ADN rau en el fet que la metilació no provoca canvis a nivell de seqüència de l'ADN. Per això s'han desenvolupat diferents mètodes per a determinar l'estat de metilació de l'ADN. En els següents apartats es detallen alguns dels mètodes més utilitzats en els darrers anys per determinar l'estat de metilació de l'ADN.

i. Bisulfitatció de l'ADN

La bisulfitatció de l'ADN és una reacció enzimàtica en la qual les citosines que no estan metilades són convertides en uracils i, en canvi, les citosines metilades no són modificades (Patterson et al., 2011). Aquesta reacció es dona en 3 passos: primer una sulfonació, després una deaminació i finalment una desulfonació. A la figura 10 es representen els diferents passos de la reacció química de la bisulfitatció de l'ADN.

La bisulfitatció de l'ADN permet diferenciar les citosines metilades de les no metilades mitjançant, per exemple, tècniques de seqüenciació.

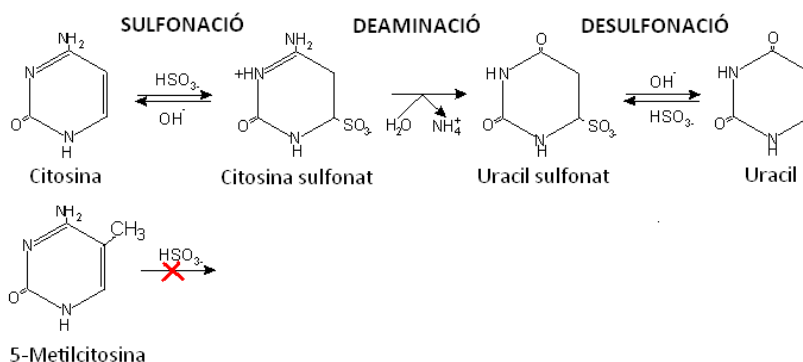


Figura 10. Bisulfitatció de l'ADN. La citosina no metilada, en presència de ions bisulfid (HSO₃⁻) passa a citosina sulfonat, la qual, en un pH baix, és desaminada i se n'obté uracil sulfonat. Aquest, en pujar el pH, és desulfonat obtenint-ne uracil. La 5-metilcitosina no és susceptible de ser bisulfitada.

ii. PCR específica de metilació

Les PCR específiques de metilació es basen en dissenyar els encebadors de manera que discriminin entre regions metilades i no metilades després de la bisulfitatció de l'ADN. D'aquesta manera, l'amplificació o la no amplificació del fragment d'ADN indica si hi ha metilació o no de les citosines d'aquesta regió concreta. El problema d'aquesta tècnica rau en la presència de falsos negatius que poden ser deguts a errors tècnics produïts durant la reacció de PCR.

iii. Piroseqüenciació de l'ADN bisulfitat

La piroseqüenciació de l'ADN bisulfitat és una tècnica de seqüenciació que permet seqüenciar regions del genoma que inclouen dinucleòtids CpG mitjançant la qual s'obté un percentatge de metilació de cadascuna de les citosines que formen part d'un dinucleòtid CpG. Aquesta tècnica im-

plica un primer pas de bisulfitatció de l'ADN, l'amplificació mitjançant PCR de la regió d'interès, l'aïllament d'una de les dues cadenes d'ADN i la piroseqüenciació d'una de les dues cadenes de l'ADN mitjançant un encebador de seqüenciació (Tost and Gut, 2007). La reacció de piroseqüenciació consisteix en incorporar nucleòtid a nucleòtid, de manera que quan s'allibera el fosfat provinent de la formació de l'enllaç fosfodièster entre els dos nucleòtids, l'enzim ATP-sulfurilasa allibera una molècula d'ATP que és utilitzada per l'enzim luciferasa per produir una senyal lluminosa. Aquesta senyal lluminosa és captada per l'aparell piroseqüenciador, el qual genera un pirograma on s'hi representen els pics de llum obtinguts al llarg de la seqüenciació. A la figura 11 s'hi representa un esquema de la reacció de piroseqüenciació.

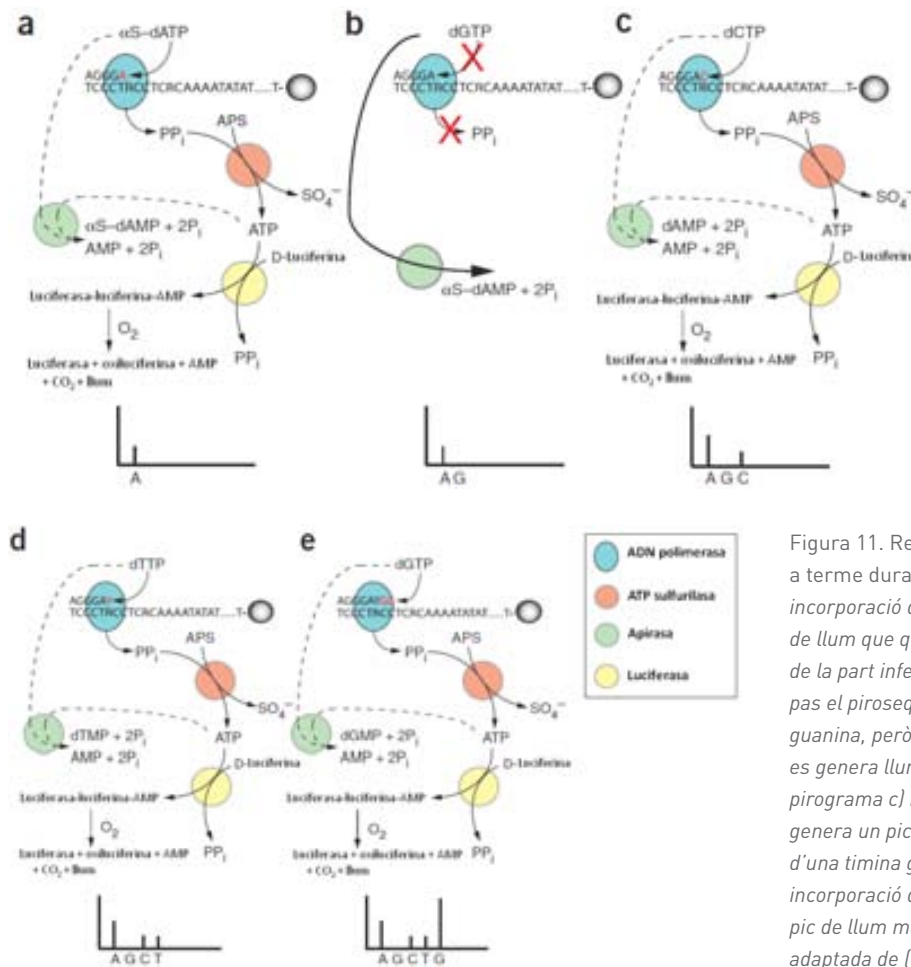


Figura 11. Reaccions enzimàtiques dutes a terme durant la piroseqüenciació. a) La incorporació d'una adenina genera un pic de llum que queda reflexat al pirograma de la part inferior de la figura b) En aquest pas el piroseqüenciador proporciona una guanina, però com que no és incorporada no es genera llum i, per tant, no queda cap pic al pirograma c) La incorporació d'una citosina genera un pic de llum d) La incorporació d'una timina genera un pic de llum e) La incorporació de dues guanines genera un pic de llum més alt que els anteriors. Figura adaptada de (Tost and Gut, 2007).

D. ESTUDIS DE METILACIÓ DE L'ADN A NIVELL GENÒMIC

Recentment s'han començat a realitzar estudis de metilació de l'ADN a nivell genòmic. A diferència dels estudis en gens candidats, els estudis a nivell genòmic no parteixen de cap hipòtesi prèvia i permeten realitzar una anàlisi de l'estat de metilació de tot el genoma.

Abans de l'aparició d'aquests estudis, els resultats indicaven que la metilació de l'ADN es concentrava en les regions promotores dels gens amb illes CpG i que aquesta metilació era crucial a l'hora de determinar si es produiria expressió gènica o no. Els resultats obtinguts mitjançant els estudis de metilació a nivell genòmic han demostrat que existeixen altres regions genòmiques on es produeixen canvis en el patró de metilació de l'ADN que sembla que són importants per a la regulació de l'expressió de determinats gens. Tot i aquests avenços, la metilació de l'ADN és un camp on hi manquen encara molts descobriments per tal de poder arribar a entendre la totalitat dels mecanismes que hi estan implicats.

Abans de realitzar un estudi de metilació a nivell genòmic és necessari realitzar un tractament previ de l'ADN que sigui dependent de metilació. Existeixen 3 tipus de tractaments principals: la digestió enzimàtica mitjançant endonucleases, l'enriquiment per afinitat a la metilació i la bisulfatció de l'ADN (Laird, 2010). En els següents apartats explicarem els mètodes més utilitzats per tal d'analitzar la metilació de l'ADN a nivell genòmic en funció d'aquests tractaments previs.

i. Digestió enzimàtica mitjançant endonucleases

Les endonucleases són enzims de restricció que trenquen l'enllaç fosfodièster de les cadenes de nucleòtids. Algunes endonucleases són sensibles a la presència o absència de metilació. Per exemple, l'enzim *SmaI* reconeix i talla la seqüència "CCGG", independentment de l'estat de metilació; en canvi, l'enzim *MspI* reconeix i talla la mateixa seqüència només en el cas que aquesta estigui metilada.

Un cop l'ADN ha estat tractat amb endonucleases, es poden utilitzar dues estratègies diferents:

- Ús d'*arrays* d'hibridació: l'ADN tractat amb una endonucleasa o una altra s'hibrida en *arrays* que, en funció del seu disseny, poden incloure diferents regions genòmiques. Així es pot determinar si una regió està metilada o no en funció de quina endonucleasa s'hagi utilitzat. Un exemple n'és el mètode HELP el qual consisteix en digerir l'ADN amb l'enzim *HpaII* o *MspI*, amplificar els fragments obtinguts i hibridar-los en un *array* (Schumacher et al., 2006).
- Seqüenciació: l'ADN digerit mitjançant endonucleases es sotmet a un protocol de seqüenciació. Aquests són més flexibles i potents que els *arrays* ja que no parteixen de dissenys previs (els quals només representen una part del genoma), requereixen una quantitat menor d'ADN i eviten l'aparició dels artefactes d'hibridació. Un exemple n'és el HELP-seq, el qual parteix de l'ADN digerit igual que en el mètode HELP, però aquest és seqüenciat enlloc de ser hibridat en un *array* (Oda et al., 2009).

L'ús d'endonucleases com a tractament previ als estudis de metilació està entrant en desús ja que genera una quantitat elevada de resultats falsos positius degut a digestions incompletes.

ii. Enriquiment per afinitat a la metilació

L'enriquiment per afinitat a la metilació consisteix en utilitzar anticossos o bé proteïnes que reconeixen i s'uneixen a l'ADN metilat. D'aquesta manera, s'aconsegueix una mostra enriquida en ADN metilat que pot analitzar-se mitjançant *arrays* d'hibridació, com es realitza a la tècnica MeDIP (Weber et al., 2005), o mitjançant tècniques de seqüenciació, com es fa al mètode MBD-seq (Meaburn and Schulz, 2011).

iii. Bisulfitació de l'ADN

El tractament de l'ADN mitjançant bisulfitació permet diferenciar a nivell de seqüència entre les citosines metilades i les no metilades. Així, l'ADN bisulfitat es pot analitzar mitjançant *arrays* d'hibridació, com per exemple els *arrays* de la plataforma Infinium, o bé es pot seqüenciar (Wu et al., 2013), com es fa a la tècnica RRBS (Smith et al., 2009).

E. L'EPIGENÈTICA I ELS TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS

La manca de troballes concloents a l'hora d'explicar la base genètica de varies malalties neurològiques ha fet que recentment es comenci a buscar una base epigenètica capaç d'explicar la susceptibilitat a patir aquestes malalties o bé d'explicar la pròpia causa d'aquestes. En aquest cas no parlem de malalties monogèniques, la causa de les quals es basa en la presència de mutacions en un sol gen, sinó de malalties genètiques complexes, la causa de les quals es basa tant en factors genètics com ambientals. L'epigenètica és un mecanisme que probablement està implicat en la modulació dels efectes d'aquests factors ambientals sobre les malalties genètiques complexes.

S'han descrit varis estudis que relacionen el mal funcionament dels mecanismes epigenètics amb el desenvolupament de malalties neurològiques (Jakovcevski and Akbarian, 2012; Gos, 2013; Qureshi and Mehler, 2013; Weng et al., 2013; Zhang et al., 2013). Un exemple en són les mutacions en el gen *MECP2* que causen la síndrome de Rett. El gen *MECP2* codifica una proteïna que conté dominis d'unió a grups metil (MBD) i actua com a repressor o activador de la transcripció (Kubota et al., 2013). En el camp de les malalties relacionades amb el retard intel·lectual també s'han trobat mutacions causals en varis gens involucrats en diferents mecanismes epigenètics, com per exemple el gen *DNMT3B*, que codifica una ADN-metiltransferasa involucrada en la metilació *de novo* de l'ADN; el gen *HDAC4* que codifica una desacetilasa d'histones; o bé el gen *MED17* que codifica una proteïna reguladora de la transcripció (van Bokhoven, 2011).

També s'han descrit SNPs en gens involucrats en mecanismes epigenètics que són capaços de modificar el risc de patir malalties neurològiques o bé d'augmentar el risc de que aquestes progressin. En són exemples variants dels gens *SIRT4*, *HDAC11* i *HDAC9*, que codifiquen factors epigenètics implicats en l'acetilació d'histones, relacionades amb el nivell de severitat de l'esclerosi múltiple (Inkster et al., 2013) o bé amb el risc de patir un ictus cerebral (Bellenguez et al., 2012).

L'epilèpsia és una malaltia paroxística que està molt lligada a la migranya. De fet, a la ICHD-III β , dins de l'apartat que inclou les complicacions de la migranya, existeix una entitat definida per les convulsions epilèptiques desencadenades per la migranya amb aura. Aquest subtipus de migranya es caracteritza pel desenvolupament de crisis epilèptiques en pacients amb migranya amb aura durant o fins una hora després d'haver patit una crisi de migranya amb aura. Aquest fenomen s'anomena amb el terme de "Migralèpsia" (Sances et al., 2009). Un altre lligam que uneix la migranya i l'epilèpsia és el tractament preventiu utilitzat en ambdues malalties. Pel que fa a l'epilèpsia, s'han descrit varis mecanismes epigenètics involucrats en el seu desenvolupament; tant mecanismes que regulen l'acció de factors transcripcionals, com mecanismes involucrats en la metilació de l'ADN, en la modificació d'histones i en l'acció de microARNs (Hwang et al., 2013). En una publicació recent, es va realitzar un estudi de metilació a nivell genòmic en un model de *status epilepticus* en ratolí on es va veure que les crisis epilèptiques induïen l'alteració de la metilació de l'ADN en més de 300 gens (Miller-Delaney et al., 2012).

També són interessants els estudis que relacionen el dolor amb una incorrecta regulació d'algun dels mecanismes epigenètics (Stone and Szyf, 2013). Per exemple, en un estudi es va relacionar el dolor crònic d'esquena amb la metilació del promotor del gen *SPARC* en els discs intervertebrals (Tajerian et al., 2011). També recentment s'ha publicat un estudi on es demostra que diferents tractaments inhibidors de l'acetilació d'histones regulen alguns dels símptomes d'un model experimental de dolor neuropàtic (Matsushita et al., 2013).

F. L'EPIGÈNÈTICA I LA MIGRANYA

Existeixen diferents fets que podrien indicar el paper dels mecanismes epigenètics en el desenvolupament de la susceptibilitat a patir migranya.

D'una banda, l'associació existent entre els mecanismes epigenètics i d'altres malalties neurològiques, com per exemple l'epilèpsia, i el dolor fan pensar que probablement també tinguin un paper en el desenvolupament de la migranya o bé en la susceptibilitat de patir-la.

D'altra banda, el fet que l'heretabilitat de la migranya s'hagi establert, aproximadament, en un 50%. Això indica que la meitat del risc de ser migranyós és atribuïble a la genètica i l'altra meitat és atribuïble als factors ambientals. Els mecanismes epigenètics estan implicats en la modulació dels efectes d'aquests factors ambientals. De fet, recentment s'ha publicat una revisió on es remarca el possible paper que tenen els mecanismes epigenètics en la migranya (Eising et al., 2013a), el qual queda resumit a la figura 12. D'una banda s'indica que alguns dels factors externs que regulen la susceptibilitat de patir una migranya estan relacionats amb l'acció de diferents mecanismes epigenètics. En són un exemple els estrògens, els quals estan estretament lligats a la fisiopatologia de la migranya i alhora s'ha vist que regulen l'expressió de varis gens modificant la metilació dels seus promotors (Green and Han, 2011). També l'estrès, que és un modulador de la freqüència de les crisis migranyoses, és un sistema que està involucrat en la metilació dels promotors de diferents gens (Hunter, 2012). També es remarca que alguns dels gens que s'han associat a migranya mitjançant estudis d'associació a nivell genòmic (GWAS) estan involucrats en diferents mecanismes epigenètics, com per exemple el gen *MTHFR*, el qual és necessari per la metilació de l'ADN (Schurks et al., 2010); i el gen *MEF2D*, el qual dirigeix les metiltransferases cap als gens que s'han de metilar (Freilinger et al., 2012).

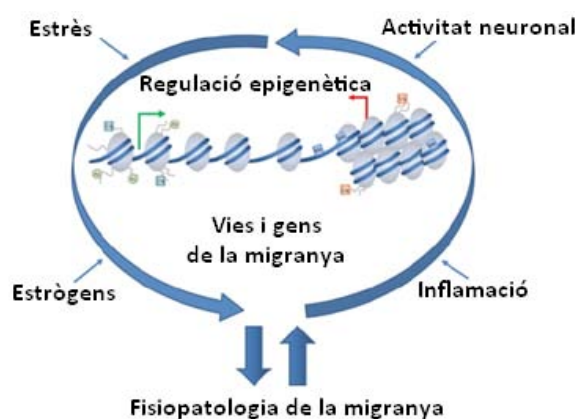


Figura 12. Efecte de l'epigenètica en la migranya. Diferents factors com són les hormones, l'estrès, l'activitat neuronal i la inflamació poden afectar directa o indirectament en l'expressió de gens involucrats en la migranya. Figura adaptada de (Eising et al., 2013a).

Actualment només existeix un estudi que relacioni la migranya amb l'epigenètica, el qual ha estat publicat molt recentment (Labruijere et al., 2014). En aquest estudi es fa una primera anàlisi en un model de rata on es compara la metilació de gens que probablement estan involucrats en la generació de les crisis migranyoses i que possiblement estan regulats per mecanismes epigenètics en diferents teixits relacionats amb la fisiopatologia de la migranya. També s'analitza l'efecte de l'estradiol en la metilació d'aquests gens. Finalment, es compara la metilació dels mateixos gens en leucòcits obtinguts de rata i d'una cohort de dones sanes. Els resultats d'aquest estudi permeten concloure que la metilació dels gens estudiats és variable, depenent de teixit i que els resultats obtinguts en leucòcits no poden ésser extrapolats a d'altres teixits. També s'ha vist que existeix una gran concordança entre la metilació de l'ADN en leucòcits de rata i d'humans, suggerint que els models de rata són útils per tal d'estudiar la metilació de l'ADN, ja que els resultats poden ser extrapolables als obtinguts en teixits humans. En relació a l'efecte de l'estradiol, no es va trobar cap diferència en la metilació dels gens estudiats.

OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat aprofundir en el coneixement genètic i/o epigenètic dels trastorns neurològics paroxístics tant pediàtrics com de l'adult.

Per assolir aquest objectiu principal es van marcar els següents objectius específics:

1. Seqüenciar gens candidats en 5 trastorns neurològics paroxístics: el torticolí paroxístic benigne del lactant, l'hemiplegia alternant de la infància, la discinèsia paroxística cinesigènica, la síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1 i la migranya hemiplègica.
2. Seqüenciar l'exoma en un individu afecte de migranya hemiplègica familiar, en combinació amb la informació obtinguda d'una anàlisi de lligament a nivell genòmic.
3. Estudiar les variants polimòrfiques implicades en la migranya sense aura mitjançant un estudi d'associació a nivell genòmic.
4. Determinar la implicació de l'epigenètica en un model animal de depressió cortical propagada, el correlat preclínic de l'aura migranyosa.

RESULTATS

1. SEQÜENCIACIÓ DE GENS CANDIDATS EN TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS

En aquest apartat es presenten 6 estudis on s'analitzen les bases genètiques de 5 trastorns neurològics paroxístics. La metodologia utilitzada ha estat la mateixa en els cinc estudis, ja que tots ells es basen en la seqüenciació de gens candidats en una família d'individus afectes o bé en una cohort de pacients.

En els casos on els resultats s'han publicat en forma d'article científic, es presenta un resum dels resultats i l'article publicat. En els casos on els resultats no s'han publicat, es presenta un resum dels resultats i, a més a més, es detallen els objectius, els materials i mètodes i els resultats de l'estudi.

En el primer estudi (Article 1) es presenten dos casos d'una mateixa família de torticoli paroxístic benigne del lactant associat a mutacions al gen *CACNA1A*.

En el segon estudi (Article 2) s'analitza una cohort de 10 pacients d'hemiplegia alternant de la infància, associada a mutacions en el gen *ATP1A3*.

En el tercer estudi (Annex 1) s'estudien les mutacions del gen *PRRT2* en una cohort de pacients de discinèsia paroxística cinesigènica.

En el quart estudi (Annex 2) s'estudien les mutacions mitjançant seqüenciació i *MLPA* del gen *SLC2A1* en una cohort de pacients del síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1.

En el cinquè i el sisè estudi (Annex 3 i 4) es realitza un cribratge mutacional en una cohort de pacients de migranya hemiplègica. L'annex 3 es correspon amb un article publicat on s'analitzen els gens associats a migranya hemiplègica tipus 1 (gen *CACNA1A*) i tipus 2 (gen *ATP1A2*). A l'annex 4 es presenta un estudi del gen associat a migranya hemiplègica tipus 3 (gen *SCN1A*) en la mateixa cohort de pacients.

A. ARTICLE 1

UNA MUTACIÓ DE PÈRDUA DE FUNCIÓ EN EL GEN *CACNA1A* CAUSA TORTICOLI PAROXÍSTIC BENIGNE DEL LACTANT

RESUM

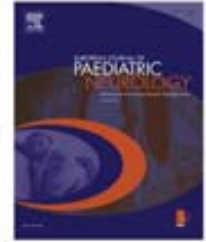
El torticoli paroxístic benigne del lactant (TPBL) és un trastorn paroxístic rar caracteritzat per episodis recurrents d'inclinació del cap cap a un costat acompanyats de símptomes generals que remeten espontàniament. En alguna ocasió s'ha descrit a la literatura l'associació entre les mutacions de guany de funció del gen *CACNA1A* i el TPBL, igual que en la migranya hemiplègica. En aquest estudi es presenten 2 pacients nous de TPBL, pertanyents a la mateixa família, portadors de la mutació p.Glu533Lys al gen *CACNA1A*. L'anàlisi funcional indica que aquesta mutació provoca una pèrdua de la funció del canal degut a una afectació en l'obertura d'aquest. Els nostres resultats suggereixen que el TPBL, una síndrome periòdica normalment considerada com a precursor de la migranya, constitueix una manifestació específica de l'edat pediàtrica d'una activitat defectuosa del canal de calci neuronal.

REFERÈNCIA

Vila-Pueyo M, Gene GG, Flotats-Bastardes M, Elorza X, Sintas C, Valverde MA, Cormand B, Fernandez-Fernandez JM, Macaya A (2014) A loss-of-function *CACNA1A* mutation causing benign paroxysmal torticollis of infancy. *Eur J Paediatr Neurol* 18:430-433.



Official Journal of the European Paediatric Neurology Society



Case study

A loss-of-function CACNA1A mutation causing benign paroxysmal torticollis of infancy



Marta Vila-Pueyo^{a,g}, Gemma G. Gené^{b,g}, Marina Flotats-Bastardes^c,
Xabier Elorza^b, Cèlia Sintas^{d,e,f}, Miguel A. Valverde^b, Bru Cormand^{d,e,f},
José M. Fernández-Fernández^b, Alfons Macaya^{a,c,*}

^a Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

^c Secció de Neurologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^d Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

^e Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^f Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2013

Received in revised form

25 November 2013

Accepted 23 December 2013

Keywords:

Benign paroxysmal torticollis of infancy

CACNA1A

P/Q channel

Patch clamp

Genetics

ABSTRACT

Benign paroxysmal torticollis of infancy (BPTI) is a rare paroxysmal disorder characterized by recurrent episodes of head tilt and accompanying general symptoms which remit spontaneously. The rare association with gain-of-function CACNA1A mutations, similar to hemiplegic migraine, has been reported. We report here two new BPTI patients from the same family carrying a heterozygous mutation in the CACNA1A gene leading to the change p.Glu533Lys. Functional analysis revealed that this mutation induces a loss of channel function due to impaired gating by voltage and much lower current density. Our data suggest that BPTI, a periodic syndrome commonly considered a migraine precursor, constitutes an age-specific manifestation of defective neuronal calcium channel activity.

© 2014 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Benign paroxysmal torticollis of infancy (BPTI) is a rare paroxysmal disorder characterized by recurrent episodes of

head tilt to one side and variable behavioral and autonomic changes. Attacks start during infancy, last minutes to days and usually recur monthly. They are accompanied by one or more of the following signs: pallor, irritability, malaise, vomiting and ataxia. Neurological examination between

* Corresponding author. Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Edifici Mediterrània, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934893890; fax: +34 934894102.

E-mail address: amacaya@vhebron.net (A. Macaya).

† These authors contributed equally to this work.

1090-3798/\$ – see front matter © 2014 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.12.011>

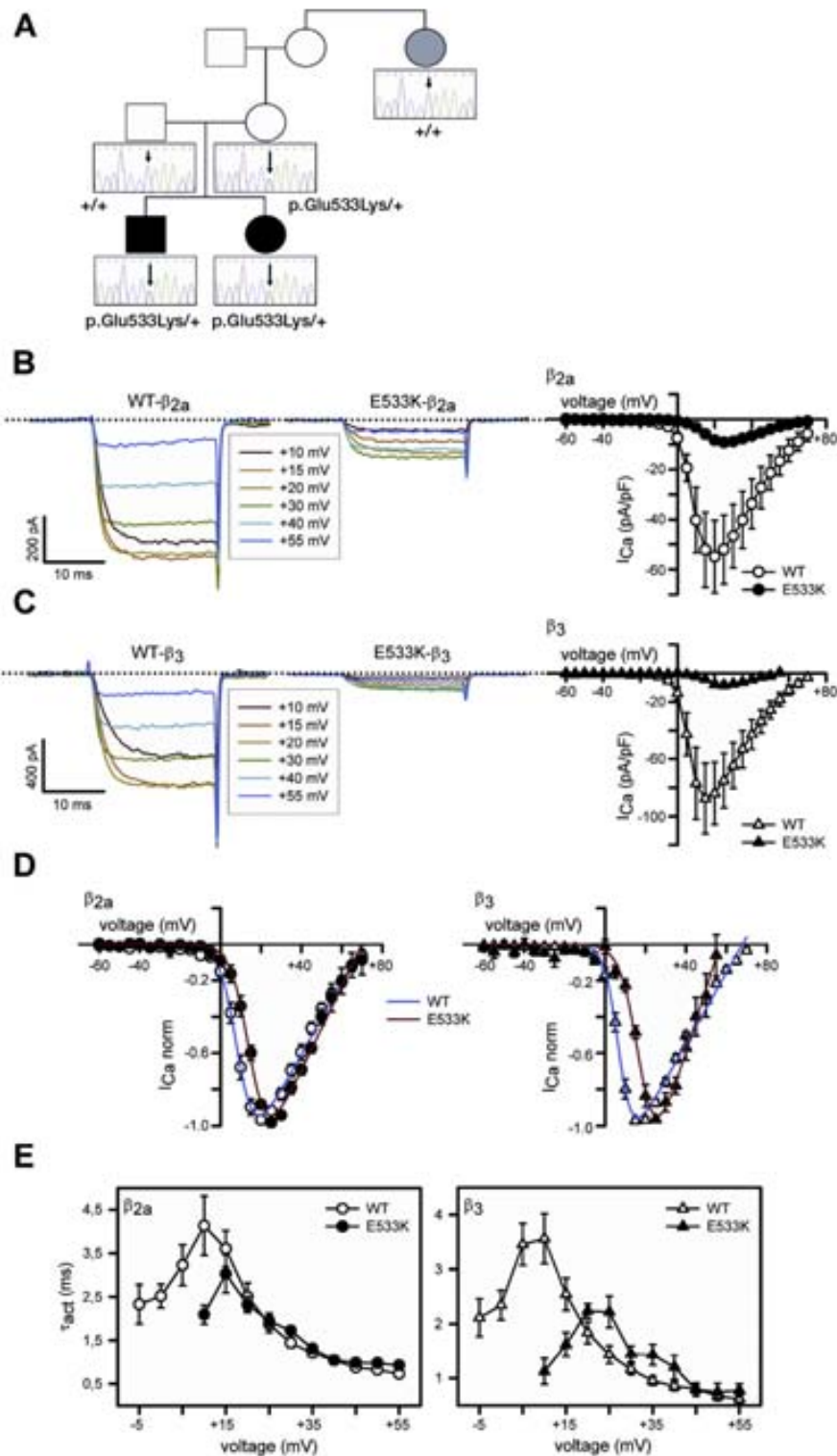


Fig. 1 – A) Pedigree of the family with the electropherograms showing the mutated or the wild-type residue in CACNA1A. White symbols indicate healthy individuals, black BPT1 and grey epilepsy. B-C) Current traces illustrating voltage-dependence and activation kinetics (τ_{act}) of WT (left) and p.Glu533Lys (center) $Ca_v2.1$ channels, in response to 20 ms voltage pulses. Dotted lines in the current traces indicate the zero current level. Current density–voltage relationships are shown in the right panels (B: for channels containing the β_{2a} subunit; C: for channels containing the β_3 subunit). D) Normalized $I-V$ curves for WT (open symbols) and p.Glu533Lys (closed symbols) $Ca_v2.1$ channels expressed in HEK293 cells. A modified Boltzmann equation was fitted to normalized current–voltage ($I-V$) to obtain the voltage dependence of activation for each $Ca_v2.1$ channel (indicated by $V_{1/2, act}$ values): $I = G_{max}(V - V_{rev}) / (1 + \exp(-(V - V_{1/2, act})/k_{act}))$. $V_{1/2, act}$ values were (in mV): WT β_{2a} (\circ , $n = 10$) 8.8 ± 1.1 ; p.Glu533Lys β_{2a} (\bullet , $n = 11$) 14.5 ± 0.7 ; WT β_{3a} (\triangle , $n = 9$) 7.1 ± 0.8 ; p.Glu533Lys β_3 (\blacktriangle , $n = 8$) 17.3 ± 0.9 . E) Average τ_{act} of WT (open symbols) and p.Glu533Lys channels (closed symbols) at the indicated voltages. The presence of either the regulatory β_{2a} subunit or the β_3 subunit is indicated at each panel. Data are presented as the means \pm S.E.M. Statistical tests included Student's t test or Mann–Whitney test, as appropriate. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

episodes is normal. It usually improves by age 2 years and tends to resolve by age 3–5, often evolving into benign paroxysmal vertigo (BPV)¹ or migraine with aura (MA).

There is some clinical and genetic evidence pointing to this childhood periodic syndrome as one of the infantile migraine precursors. Clinically, it is a paroxysmal disorder with accompanying signs similar to some of the non-headache features of migraine. Genetically, it has been occasionally associated with mutations in *CACNA1A*, a gene that encodes the ion-conducting pore and voltage-sensing α subunit of the neuronal $Ca_v2.1$ (P/Q-type) calcium channel and that has been linked to familial hemiplegic migraine (FHM).

We report a new case of this clinical-genetic association and provide functional evidence that the mutation is indeed disease-causing.

2. Case study

A 3-year-old boy was referred with a history of recurrent episodes of torticollis starting at the age of 9 months and occurring twice per month ever since. He experienced acute episodes of lateral flexion of neck, with ipsilateral flexion of the trunk and ataxia, and no useful ipsilateral hand movement. During the episodes, which lasted no longer than 5 min and were relieved by sleep, the patient became irritable, unsteady, aphasic and held onto his mother. No nystagmus or loss of consciousness were recorded. After age 2 years the patient appeared drowsy and apathetic during the episodes. His psychomotor development and interictal examination are normal. No pharmacological treatment was attempted due to the low frequency of the attacks at the age of referral. Her 10-year-old sister had experienced similar attacks between ages 13 months and 3 years. They occurred monthly and lasted from 30 min to 24 h and some reportedly associated upgaze deviation and severe global hypotonia. Treatment with carbamazepine worsened them. Her EEG and RM were normal. No overt migraine attacks have developed.

Peripheral blood samples were collected from both patients, parents and an epileptic aunt. Genomic DNA was isolated using a standard salting-out method. Promoter, all exons and flanking intronic regions of *CACNA1A* were amplified by PCR, purified and sequenced using BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and the automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Copy Number Variant (CNV) studies for *CACNA1A* were performed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) using the SALSA MLPA kit P279-A2 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) and Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF) using four sets of primer pairs that covered 16 additional exons (details available upon request).

A heterozygous G to A transition at cDNA position 1597 (c.1597G > A, reference sequence GeneBank NM_023035) was found in both patients and their asymptomatic mother, but not in their father nor their aunt (Fig. 1A). This mutation results in a substitution of glutamate for lysine at residue 533 (p.Glu533Lys). Such residue is located at the second voltage sensor domain (VSD) of the $Ca_v2.1$ channel and it has been suggested to necessarily contribute to the energy pathway

required for the movement of the voltage sensor to gate the channel. No CNV was found.

$Ca_v2.1$ wild-type (WT) and p.Glu533Lys (E533K) mutant human channels were heterologously expressed in HEK293 cells and analyzed using the whole-cell patch clamp technique as previously described.² We observed a significant decrease in maximum current density in the mutant p.Glu533Lys compared to WT P/Q channels containing functionally different regulatory β subunits (in channels containing the β_{2a} subunit: from -54.9 ± 14.6 pA/pF ($n = 10$) to -9.2 ± 1.6 pA/pF ($n = 11$), $P < 0.01$ (Fig. 1B); in channels containing the β_3 subunit: from -87.6 ± 24.5 pA/pF ($n = 9$) to -8.3 ± 1.9 pA/pF ($n = 8$), $P < 0.001$ (Fig. 1C)). The potential for half-maximal activation ($V_{1/2, act}$) was also significantly shifted to depolarized potentials for p.Glu533Lys channels (by ~ 6 mV for channels containing the β_{2a} subunit ($P < 0.001$) and by ~ 10 mV for channels containing the β_3 subunit ($P < 0.0001$)). Consistently, the maximum current amplitude was elicited by depolarizing pulses to $+20/+15$ mV or $+25$ mV for WT or p.Glu533Lys channels, respectively (Fig. 1D). Furthermore, activation kinetics of p.Glu533Lys mutant channels were also right shifted (by ~ 5 mV for channels containing the β_{2a} subunit and by ~ 10 mV for channels containing the β_3 subunit when compared to WT channels) (Fig. 1E).

3. Discussion

We have described the unusual instance of two sibs with BPTI carrying a loss-of-function mutation in *CACNA1A*. This observation adds to previous evidence suggesting that BPTI can be an early manifestation of a calcium neuronal channelopathy.

Because of the accompanying general symptoms, complete recovery between attacks, development of migraine or other related syndromes at follow-up, and the presence of family history of migraine, BPTI is often considered a childhood migraine precursor or equivalent. In fact, three previous reports have identified mutations in *CACNA1A* in patients^{2,3} or in relatives of patients⁴ with BPTI. Here we report the *CACNA1A* p.Glu533Lys mutation in two siblings affected with BPTI and their presumably asymptomatic mother. The latter might have displayed reduced penetrance or have suffered the same symptoms in infancy, but without being cause of concern.

This is the fourth mutation that links this syndrome to the α subunit of the neuronal $Ca_v2.1$ channel, encoded by the *CACNA1A* gene. The first mutation (p.Tyr1854*) was found in a BPTI patient from a kindred with FHM and episodic ataxia type-2 (EA-2).⁴ The patient was described as having attacks from six weeks of age, starting with tilting of the head, head turning to the left for 15–30 min, followed by vomiting and unsteadiness of gait, and lasting 1–3 days. The second mutation (p.Tyr1245Cys) was found and functionally characterized by our group in the clinical context of neonatal BPTI that evolved with aging, first into BPV and then into HM.² The third one (p.Gln736*) was found in a BPTI patient from a kindred with paroxysmal tonic upgaze and EA.³ The patient was described as having attacks from 16 months of age, starting with head tilting, accompanied by unsteadiness, moaning,

sweating and sometimes vomiting, and lasting for one to several hours.

The results of our functional studies of the p.Glu533Lys mutation on $Ca_v2.1$ channels expressed in HEK293 cells show that this mutation induces a loss of channel function due to an impaired gating by voltage and much lower current density. The later effect might be due to a reduction in the traffic of P/Q channels to the plasma membrane, as suggested for other EA-2 mutation (p.Glu147Lys) affecting a glutamate residue placed at a similar position but on the first VSD of the $Ca_v2.1$ channel. The p.Tyr1854* was analyzed *in vitro* elsewhere showing also a loss-of-function of the mutant channel. Moreover, the premature stop codon can lead to nonsense-mediated RNA decay (NMD) of the resulting transcripts, a process that, if triggered, would induce a loss-of-function due to haploinsufficiency. The p.Gln736* mutation has not been functionally studied, but the early position of the resulting premature stop codon made the authors suppose it would lead to NMD of the mutated transcripts and therefore to haploinsufficiency of the CACNA1A protein. These mutations all lead to a loss-of-function of the channel. However, our functional analysis of the p.Tyr1245Cys mutation showed a clear gain of function due to improved channel activation by voltage and decreased direct channel inhibition by G-proteins.²

Thus, the p.Glu533Lys mutation identified in our family and the two previously described mutations with premature stop codon (p.Tyr1854* and p.Gln736*), all induce a loss-of-function of the calcium channel, the most common functional correlate of mutations causing EA-2. Indeed, the p.Glu533Lys mutation has been previously found in a EA-2 patient and her affected relatives.⁵ Her spells started at age 12, lasted about 20 min and were sometimes precipitated by stress and preceded by headache.

Mutations in the CACNA1A gene have been now associated with a wide variety of paroxysmic syndromes, including EA-2, FHM, BPTI, other childhood periodic syndromes and a variant of alternating hemiplegia of childhood (AHC).

On the basis of its association with loss-of-function CACNA1A mutations, as in the cases reported here, or with CACNA1A haploinsufficiency, we hypothesize that BPTI may represent an age-specific, early manifestation of defective neuronal calcium channel activity.

Acknowledgments

The work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) Funds, and Plan E (Grants SAF2009-13182-C01, C02 and C03, SAF2012-31089, SAF2012-38140), Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES RD12/0042/0014) and Generalitat de Catalunya (grants 2009SGR1369, 2009SGR0971 and 2009SGR0078). MAV is the recipient of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya). MV-P was supported by a predoctoral grant from VHIR, Barcelona (Spain).

REFERENCES

1. Jahn K. Vertigo and balance in children—diagnostic approach and insights from imaging. *Europ J Paediatr Neurol* 2011;15:289–94.
2. Serra SA, Fernandez-Castillo N, Macaya A, et al. The hemiplegic migraine-associated Y1245C mutation in CACNA1A results in a gain of channel function due to its effect on the voltage sensor and G-protein-mediated inhibition. *Pflugers Arch* 2009;458:489–502.
3. Roubertie A, Echenne B, Leydet J, et al. Benign paroxysmal tonic upgaze, benign paroxysmal torticollis, episodic ataxia and CACNA1A mutation in a family. *J Neurol* 2008;255:1600–2.
4. Giffin NJ, Benton S, Goadsby PJ. Benign paroxysmal torticollis of infancy: four new cases and linkage to CACNA1A mutation. *Dev Med Child Neurol* 2002;44:490–3.
5. Scoggan KA, Friedman JH, Bulman DE. CACNA1A mutation in a EA-2 patient responsive to acetazolamide and valproic acid. *Can J Neurol Sci* 2006;33:68–72.

B. ARTICLE 2

ANÀLISI CLÍNICA I GENÈTICA DE L'HEMIPLEGIA ALTERNANT DE LA INFÀNCIA EN 10 PACIENTS DEL SUD D'EUROPA

RESUM

L'hemiplègia alternant de la infància (HAI) és un trastorn rar del neurodesenvolupament caracteritzat per la presència de crisis hemiplègiques i d'altres manifestacions paroxístiques i no paroxístiques que comporten un empitjorament neurològic progressiu. S'han identificat mutacions *de novo* en el 80% dels pacients. La HAI també ha estat associada a mutacions rares en d'altres gens involucrats en trastorns neurològics episòdics.

L'objectiu d'aquest estudi es va centrar en identificar mutacions en els gens *ATP1A3*, *CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* i *SLC2A1* en una cohort de 10 pacients no emparentats d'Espanya i Grècia que compleixen els criteris establerts pel diagnòstic de la HAI.

Els 5 gens van ser amplificats mitjançant PCR i van ser seqüenciats mitjançant seqüenciació Sanger. Es va fer una anàlisi de la variació en el nombre de còpies dels gens *SLC2A1* i *CACNA1A* mitjançant dues aproximacions diferents.

Es van identificar 3 mutacions de canvi de sentit en el gen *ATP1A3* en 5 dels pacients. Les 3 mutacions havien estat prèviament descrites (p.Asp801Asn, p.Glu815Lys i p.Gly947Arg), es trobaven en heterozigosi i eren *de novo*. Els pacients portadors de les mutacions presentaven una edat d'inici de la HAI més primerenca en comparació als no portadors. El retard mental era més greu en el cas de la mutació p.Glu815Lys. Un dels portadors de la mutació p.Gly947Arg també era portador de la variant p.Ala454Thr al gen *CACNA1A*, la qual havia estat heretada per via materna. Un aspecte de rellevància clínica va ser la bona resposta en 3 dels pacients a l'aplicació de la dieta cetogènica. No es van trobar mutacions en els altres gens seqüenciats.

Aquest estudi confirma la presència de mutacions en el gen *ATP1A3* en la meitat dels pacients de HAI analitzats. Caldria realitzar més estudis genètics en d'altres cohorts de pacients de HAI per tal d'investigar la presència de grans reordenaments cromosòmics al gen *ATP1A3* o bé considerar que existeix una heterogeneïtat genètica més elevada del que es pensava inicialment.

REFERÈNCIA

Vila-Pueyo M, Pons R, Raspall-Chaure M, Marcé-Grau A, Carreño O, Sintas C, Cormand B, Pineda-Marfà M, Macaya A (2014) Clinical and Genetic Analysis in Alternating Hemiplegia of Childhood: Ten New Patients from Southern Europe. *Journal of the Neurological Sciences* (Epub ahead of print).



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of the Neurological Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jns

Clinical and genetic analysis in alternating hemiplegia of childhood: Ten new patients from Southern Europe

Marta Vila-Pueyo^a, Roser Pons^b, Miquel Raspall-Chaure^a, Anna Marcé-Grau^a, Oriol Carreño^{c,d,e}, Cèlia Sintas^{c,d,e}, Bru Cormand^{c,d,e}, Mercè Pineda-Marfà^f, Alfons Macaya^{a,*}

^a Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b First Department of Pediatrics, Agia Sofia Hospital, University of Athens, Athens, Greece

^c Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

^d Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^e Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

^f Pediatric Neurology Department, Teknon Clinic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 9 June 2014

Available online xxxxx

Keywords:

Alternating hemiplegia of childhood

ATPIA3

CACNA1A

Genetics

Ketogenic diet

Neurodevelopmental syndrome

ABSTRACT

Alternating hemiplegia of childhood (AHC) is a rare neurodevelopmental disorder featuring attacks of hemiplegia and other paroxysmal and non-paroxysmal manifestations leading to progressive neurological impairment. De novo mutations in *ATPIA3* have been identified in up to 80% of patients. AHC is also associated with rare mutations in other genes involved in episodic neurological disorders.

We sought to find mutations in *ATPIA3*, *CACNA1A*, *ATPIA2*, *SCN1A* and *SLC2A1* in a cohort of ten unrelated patients from Spain and Greece.

All patients fulfilled AHC diagnostic criteria. All five genes were amplified by PCR and Sanger sequenced. Copy number variation (CNV) analysis of *SLC2A1* and *CACNA1A* was performed using two different approaches.

We identified three previously described heterozygous missense *ATPIA3* mutations (p.Asp801Asn, p.Glu815Lys and p.Gly947Arg) in five patients. No disease-causing mutations were found in the remaining genes. All mutations occurred *de novo*; carriers presented on average earlier than non-carriers. Intellectual disability was more severe with the p.Glu815Lys variant. A p.Gly947Arg carrier harbored a maternally-inherited *CACNA1A* p.Ala454Thr variant. Of note, three of our patients exhibited remarkable clinical responses to the ketogenic diet. We confirmed *ATPIA3* mutations in half of our patients. Further AHC genetic studies will need to investigate large rearrangements in *ATPIA3* or consider greater genetic heterogeneity than previously suspected.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alternating hemiplegia of childhood (AHC) is a complex and rare neurodevelopmental syndrome that was first described by Verret and Steele in 1971 [1]. It is characterized by (i) onset of paroxysmal events before 18 months of age, (ii) repeated periods of hemiplegia involving either side of the body lasting from a few minutes to several days caused by various factors including emotional triggers, head trauma and fatigue, (iii) episodes of bilateral hemiplegia or quadriplegia of varying intensity, (iv) other paroxysmal manifestations including tonic and dystonic episodes, ocular abnormal movements (nystagmus, strabismus) and/or autonomic disturbances occurring during hemiplegic

bouts or in isolation, (v) disappearance of all abnormalities by sleep, with probable recurrence of long-lasting bouts after waking, and (vi) nonparoxysmal neurological abnormalities including developmental delay, choreoathetosis, dystonia and/or ataxia [2,3].

Analysis of whole exome sequencing in 16 proband-parent trios and whole genome sequencing in another two led to establish AHC as a genetic disorder caused by mutations in *ATPIA3*, encoding the neuronal α_3 -subunit of the Na^+/K^+ -ATPase pump [4–6]. Subsequent molecular analysis in 143 additional AHC patients revealed the presence of mutations in 112 of them [4–8]; the negative results in approximately 20% of patients may indicate some degree of genetic heterogeneity in AHC. In fact, some reports have linked AHC, or a very similar phenotype, to mutations in three genes encoding ionic channels or solute carriers expressed in the central nervous system: *CACNA1A* [9], *ATPIA2* [10,11] and *SLC2A1* [12].

In the present study, we sought to determine whether mutations in *ATPIA3* or in any of the three genes involved in familial hemiplegic migraine (FHM), *CACNA1A*, *ATPIA2* and *SCN1A* or in glucose transporter

* Corresponding author at: Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Edifici Mediterrània, Institut de Recerca Vall d'Hebron Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934893890; fax: +34 934894102.

E-mail address: amacaya@vhebron.net (A. Macaya).

type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS), *SLC2A1*, were linked to AHC in a cohort of 10 unrelated patients from Spain and Greece.

2. Subjects

Ten sporadic AHC patients who clinically fulfilled the previously described criteria for the disorder [2,3] were recruited by neurologists at four Spanish or Greek centers. After obtaining informed consent from all patient parents or custodians, blood samples were collected and genomic DNA was extracted following standard procedures [13]. The study was approved by the local Ethics Committee at Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona.

3. Methods

3.1. Mutation screening

All promoters, exons and flanking intronic regions of *ATPIA3*, *CACNA1A*, *ATPIA2* and *SLC2A1* genes and the five FHM-associated *SCN1A* exons (number 6, 17, 23, 24 and 26) and flanking intronic regions were amplified by PCR in all the patients (details available upon request). Purified PCR products were sequenced using the BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and the automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All mutations were assessed by bidirectional sequencing. Inheritance of mutations was determined after sequencing the parents of all mutation carriers.

Mutation nomenclature follows HGVS guidelines (www.hgvs.org/mutnomen) and refers to the *ATPIA3* cDNA sequence NM_152296.4 (protein sequence NP_689509.1) and to the *CACNA1A* cDNA sequence NM_023035.2 (protein sequence NP_075461.2) with +1 corresponding to A of the ATG translation initiation codons.

3.2. Copy number variant analysis

Copy number variation (CNV) studies for *SLC2A1* and *CACNA1A* were performed. For *SLC2A1* we analyzed all exons with the Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) assay by using the SALSA MLPA kit P138 for *SLC2A1* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). For *CACNA1A* we used two complementary approaches to maximize gene coverage: MLPA and Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF). For the MLPA assay we used the SALSA MLPA kit P279-A2 for *CACNA1A* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) and for QMPSF we used four sets of primer pairs that covered 16 additional exons not included in the MLPA kit (experimental details and primer sequences available upon request).

4. Results

4.1. Clinical data

The main clinical features of the ten patients (5 females) are summarized in Table 1.

Briefly, all patients were from Southern Europe, seven from Spain and three from Greece. The age of onset varied from 0 to 18 months; present age is comprised between 6 and 36 years. Attacks lasted minutes to days with a daily to every two months frequency and featured typical motor signs including unilateral or bilateral paresis, hypotonia, dystonia, rigidity, ataxia, nystagmus or other abnormal eye movements, dysphagia, hand posturing and postictal drowsiness. Other frequently reported paroxysmal events included epileptic seizures, cyclic vomiting and migraine with aura. Over a 6–16 year follow-up period, 9/10 patients have developed different degrees of intellectual deterioration, mostly moderate to severe, and other signs of chronic, progressive neurological dysfunction, such as ataxia, dysarthria, spasticity, hypotonia,

hypertonia, dyskinesia, tremor and pyramidal signs. Microcephaly occurred in only one patient.

All patients had MRI studies, which were all normal except for patient 6 who displayed subtle bihemispheric white matter lesions. All patients showed no abnormalities on serial EEGs.

None of the patients had familial history of AHC, however six had familial history of migraine, one of a non-classified neurodegenerative disorder, one of vertigo and one of epilepsy.

Used treatments included prophylaxis with flunarizine, which often provided some degree of improvement in severity and frequency of attacks, or topiramate. Interestingly, in three patients the number and severity of attacks were markedly reduced upon institution of the ketogenic diet (KD). Patient 1 was treated for one year with KD, at age 11. She had been on flunarizine since age 3 with no clear benefit. The frequency of her dystonic attacks while on KD decreased from one per week to one every three weeks, approximately. A more dramatic improvement was recorded in her behavioral status. Both her psychologist and caregivers described frank improvement in her school performance and resolution of mood swings and sociability problems. Because of cost-effectiveness issues the family decided to stop the treatment. Patients 4 and 5 were treated with flunarizine since the disease started with poor response. Benzodiazepines were used to take them quickly to sleep and shorten the attacks: in patient 5 rectal diazepam reduced the duration of her attacks from 2 to 3 days to 4–5 h, but frequency (1–2 a week) remained unchanged; in the case of patient 4 clonazepam in his oral mucosa reduced the attacks to 3–4 h instead of 1–2 days, but their number did also not decrease. In both of them KD brought about a cessation of the hemiplegic attacks. In addition, and according to teachers and caregivers, there were improvements in their motor clumsiness, mood, attention and, though not quantified, global cognitive functions. Of note, patient 5, a 6 year-old girl, has suffered no further attacks since she was put on the diet at age 4.

4.2. Mutation screening

The extensive sequencing of the *ATPIA3* gene in ten subjects with AHC allowed the identification of three previously reported changes in five unrelated patients. We identified a G-to-A transition at cDNA position c.2401, resulting in the substitution of an aspartic acid for an asparagine at residue 801 (p.Asp801Asn), in patient 1; a G-to-A transition at cDNA position c.2443, resulting in the substitution of a glutamic acid for a lysine at residue 815 (p.Glu815Lys), in patient 2; and a G-to-A transition at cDNA position c.2839, resulting in the substitution of a glycine for an arginine at residue 947 (p.Gly947Arg), in patients 3, 4 and 5 (Fig. 1). All mutations were heterozygous and were confirmed to be *de novo*, except in patient 1 whose parental DNA was not available. However, the variant found in this patient has been previously associated with AHC in the literature.

A distinctive clinical feature of *ATPIA3*-positive vs *ATPIA3*-negative patients was an earlier onset of symptoms in the former group (average age of onset: 4.8 vs 13.4 mo).

Moreover, direct sequencing of *CACNA1A* gene revealed a heterozygous G-to-A transition at cDNA position 1360 (c.1360G>A) in patient 5, who also bore an *ATPIA3* change, and in her asymptomatic mother. This mutation results in the substitution of alanine for threonine at residue 454 (p.Ala454Thr) and is assessed as probably damaging by the prediction tool PolyPhen-2 v2.2.2 (score = 1). All mutations are listed in Table 2.

No mutations in *ATPIA2*, *SCN1A* and *SLC2A1* genes nor copy number variants in *SLC2A1* or *CACNA1A* were found in the ten patients screened.

5. Discussion

We have identified three mutations in the *ATPIA3* gene in five out of ten AHC patients from Spain and Greece. *ATPIA3* encodes the alpha-3 catalytic subunit of the Na⁺/K⁺ ATPase pump. Na⁺/K⁺ ATPases maintain

Table 1
Clinical features of 10 patients with alternating hemiplegia of childhood. M: male; F: female; mo: months; MD: migraine without aura; MA: migraine with aura; HM: hemiplegic migraine; KD: ketogenic diet; ID: intellectual disability; -: no information. Shading indicates APTA3 mutation carrier.

Patient	Origin	Present age (years) and gender	Age at onset (mo)	Attack description	Body part involvement	Duration	Frequency	Other paroxysmal events	Interictal exam	Other	Family history	Treatment (response)
	Greece	16 F	6	Paralysis Dystonia	Unilateral	Minutes-to-hours	Daily-to-weekly	-	Mild ID Dysarthria Mild-moderate spasticity Ataxia	Normal MRI, EEG, SPECT	No	Multiple antiepileptic drugs and flunarizine (no effect) KD (improved)
2	Greece	7 M	4	Flaccid paresis Ataxia	Unilateral	1-3 days	1-2/week	Dyskinesia	Severe ID and motor involvement	Normal MRI, EEG	No	Flunarizine (improved)
3	Spain	16 F	4	Flaccid paresis	Bilateral	2-7 days	2/month	Rigidity episodes	Mild ID Cerebellar ataxia	Normal MRI G57T mutation in MTHFR	MD	-
4	Spain	37 M	3	Ataxia Flaccid paresis Dystonia	Unilateral	Hours/days	2-4/month	Autonomic dysfunction	Moderate ID	Normal MRI arteriography and EEG	No	Flunarizine (no effect) KD (improved) Diazepam (shortened attacks)
5	Spain	6 F	0	Nystagmus Chorea Dystonia Flaccid paresis	Unilateral	1-12 days	1/month	-	Mild ID Squint	Normal MRI, EEG Abnormal SPECT	MD	Flunarizine & topiramate (no effect) KD (attacks abated)
6	Spain	13 M	15	Flaccid paresis "drowsiness postictally"	Unilateral	1h-1 week	6/year	Epilepsy	Severe ID	White matter hyperintensities on MRI	No	Flunarizine (improved)
7	Spain	8 F	13	Hypotonia Nystagmus Dysphagia Hand posturing	Unilateral Bilateral	2-6 days	1/month	Nystagmus	Clonus Normal cognition	Normal MRI, EEG Abnormal trial SPECT	MD	Flunarizine (improved)
8	Greece	9 M	18	Ataxia Flaccid paresis	Unilateral	Minutes-to-days	2/week	-	Developmental delay Tremor Ataxia	Normal MRI, EEG	MD Vertigo Paresthesia	Topiramate (improved)
9	Spain	16 F	3	Flaccid paresis	Unilateral	1-2 days	1/month	Epilepsy Cyclic vomiting	Severe ID Spasticity	Normal MRI, EEG	MD Epilepsy	-
10	Spain	12 M	18	Nystagmus Chorea Dystonia	Unilateral	Minutes-to-days	1-2/month	Epilepsy MA Dystonia Myoclonus	Severe ID	Normal MRI, EEG	MD HM	Diazepam (shortened attacks)

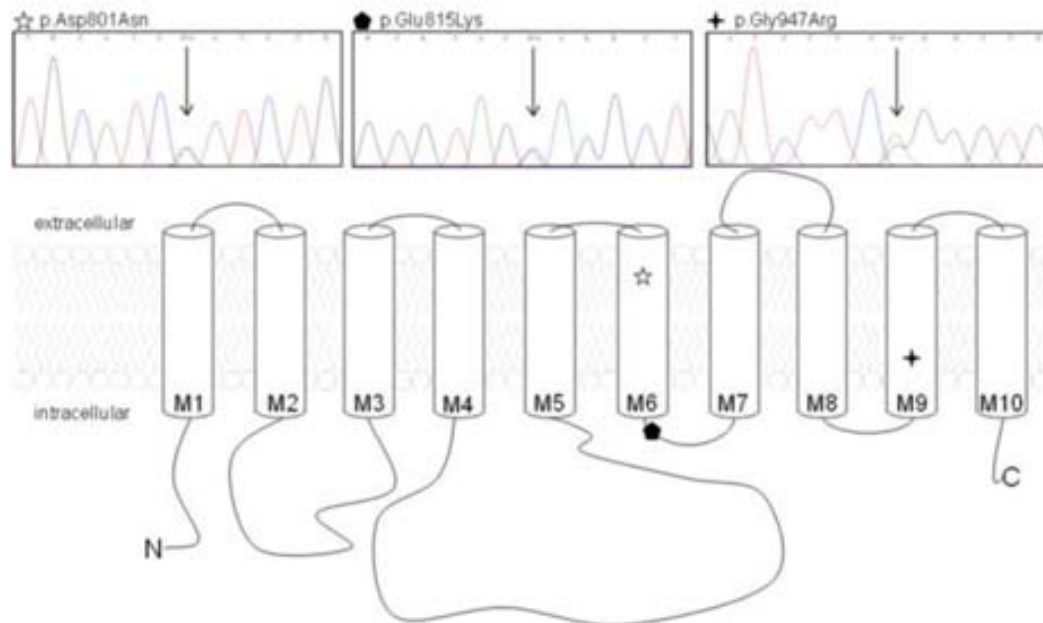


Fig. 1. Electropherograms of *ATP1A3* changes found in AHC patients and diagram of the *ATP1A3* protein indicating the positions of the mutations. Three *ATP1A3* mutations were found in five AHC patients. Mutations p.Asp801Asn and p.Gly947Arg are located within transmembrane domains M6 and M9, respectively, and p.Glu815Lys within cytoplasmic loop M6–7.

cationic gradients essential for a number of cell membrane functions, including muscle and nerve electrical excitability [13]. The ATPase alpha-3 isoform, in turn, appears to play a critical role during high-frequency activity, when intracellular Na^+ increases. Mutations in *ATP1A3*, have been described to cause at least two phenotypes: AHC and rapid-onset dystonia-parkinsonism (RODP) (DYT12), a movement disorder characterized by abrupt onset of dystonia, usually accompanied by signs of parkinsonism. A recent study proposes that the two disorders lie at both ends of a continuous phenotypic spectrum of *ATP1A3*-related disorders [15]. It was hypothesized that inability to maintain the high demand for ion transport during and after stressful events may relate to the development of abnormal movements in RODP [14]. This might be also the case in the more severe AHC phenotype, where even small stressful events may bring about more frequent and severe episodes, including status epilepticus [8]. In fact, presence of epilepsy may reflect a more profound pump dysfunction and in our series it was associated with worse global outcome.

There is evidence that the three identified amino acid substitutions are disease-causing: all are missense, have been previously described in several AHC patients and appeared *de novo*, as shown in all available trios. The mutations identified in our cohort are also the most frequent AHC-causing mutations in the five previous *ATP1A3*-screened case series, where p.Asp801Asn was the most frequent, followed by p.Glu815Lys and p.Gly947Arg [4–8]. In our series, p.Gly947Arg was the most frequently encountered mutation. All of these changes are G>A transitions located within hypermutable CpG dinucleotide sequences and have been only described as *de novo* mutations.

Recently, a Japanese study on 33 AHC cases attempted to establish genotype-phenotype correlations by grouping their case series according to the following *ATP1A3* mutation types: p.Asp801Asn, p.Glu815Lys or other mutations [8]. It was suggested that the p.Glu815Lys group had a more severe clinical course, while the p.Asp801Asn group resulted in a moderate form of AHC. Our results, despite the smaller sample size, may concur with these findings, since patients with the p.Gly947Arg or the p.Asp801Asn variants all had mild to moderate intellectual disability whereas the patient bearing the p.Glu815Lys variant had a severe and global psychomotor involvement. Conversely, patients with no mutation in *ATP1A3* also displayed variable degrees of neurological impairment, though they tended to present later in life.

Compared to ours, previous genetic studies in AHC showed a higher incidence of *ATP1A3* mutations. Although we have not ruled out the presence of *ATP1A3* CNVs in our patients, data derived from the functional analyses of *ATP1A3* mutations suggest that such CNVs would be more apt to produce a DYT12 phenotype, since DYT12-causing mutations reduce protein expression, whereas AHC-causing mutations seem to modulate pump activity [5,14]. Also, the possibility of additional AHC loci remains open, particularly considering the specific geographic origin of the present cohort.

Prior to the description of *ATP1A3* as the major genetic cause of AHC, genetic screenings in smaller AHC cohorts, or single case reports, identified mutations in three genes encoding ion-channels, i.e. *ATP1A2* [10, 11], *CACNA1A* [9] or the solute carriers *SLC2A1* [12] and *SLC1A3* [16]. The proteins encoded by three of these genes play important roles at glutamatergic synapses: *CACNA1A* encodes a presynaptic neuron

Table 2
Mutations found in five out of 10 patients with alternating hemiplegia of childhood.

Patient	Gene	Mutation				Frequency in AHC patients screened for this gene (see refs. [4–8])
		Exon	cDNA level	Protein level	Inheritance	
1	<i>ATP1A3</i>	17	c.2401G>A	p.Asp801Asn	Parental DNA unavailable	48%
2	<i>ATP1A3</i>	18	c.2443G>A	p.Glu815Lys	De novo	33%
3	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
4	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
5	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
	<i>CACNA1A</i>	11	c.1360G>A	p.Ala454Thr	Inherited from asymptomatic mother	17%

calcium channel involved in glutamate neurosecretion, while *ATP1A2* encodes the astrocytic ATPase isoform α_2 involved in glutamate reuptake; *SLC1A3*, in turn, encodes the glial glutamate and aspartate transporter EAAT1. Because of these previous findings and the existing clinical overlap between severe forms of FHM [17] and atypical AHC, we performed sequence analysis of the three known FHM genes and of *SLC2A1*, which encodes the glucose transporter at the blood–brain barrier. Mutations in *SLC2A1* are the cause of GLUT1DS, a syndrome that shows wide phenotypic variability and shares many clinical signs with AHC, such as delayed development, episodic eye movements, transient abnormal involuntary movements – including hemiparesis – and epilepsy. Mutational analysis of these four genes did not reveal the genetic cause of the disease in any of the patients that were negative in the *ATP1A3* screen. This agrees with a recent Italian study investigating *SLC2A1* mutations in AHC [18]. However, we identified the p.Ala454Thr variant in *CACNA1A* in patient 5 and her asymptomatic mother. This mutation was first considered a polymorphic variant with a frequency of 0.02 in the control population of a genetic screen performed in FHM and episodic ataxia patients [19]. It was later associated with early-onset progressive ataxia [20]. More recently, we found this mutation in two subjects displaying the milder phenotype in a family segregating both FHM and migraine with aura [21]. The functional *in vitro* analysis concluded that this mutation reduced the secretion efficiency of the channel, which prompted us to consider the p.Ala454Thr mutation as a negative modulator of the aura severity. Our patient 5 is also carrying an *ATP1A3* mutation. A possible relationship between *CACNA1A* and *ATP1A3* proteins has only been considered in a study where presynaptic Ca^{2+} buffers were shown to control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the *ATP1A3* pump [22]. This led us to speculate that the consequences of the *ATP1A3* mutation in patient 5 could be modulated by the found *CACNA1A* variant and result in a milder AHC phenotype. It is conceivable that the many genes regulating membrane excitability are liable to act as each other's modifiers in paroxysmal neurological phenotypes and that variable expression in these dominantly inherited disorders may relate to epistatic or other types of gene–gene interaction.

A unique feature of three of our patients was the clinical response to KD institution, particularly concerning the paroxysmal symptoms. This concurs with two recent observations of KD-induced amelioration of paroxysmal signs in two AHC patients carrying mutations in *ATP1A3*, both initially diagnosed with GLUT1DS and one of them effectively harboring a *SLC2A1* rare variant [23,24]. At present there is no clear rationale for the use of KD therapy in AHC. Use in our patients was empirical and occurred before molecular diagnosis was known. Institution of the diet was decided in patients with very frequent attacks and lack of response to other treatments, and was based on previous observations of an AHC-like phenotype in GLUT1DS [12] and the finding of interictal abnormal cerebral glucose metabolism in the frontal lobes, ipsilateral putamina and cerebellum in AHC Japanese patients, as detected by means of FDG-PET studies [25]. Whatever the mechanism, all three patients where KD was tried underwent a substantial reduction of attacks and a long-lasting resolution in one (patient 5), only to recur very recently in association with intense emotional stress.

Our results confirm *ATP1A3* mutations as a common cause of AHC at both ends of the Mediterranean area, but also raise the issue of the existence of genetic heterogeneity. Studies focused on AHC patients who are negative for mutations in *ATP1A3*, including data mining of their existing massive sequencing results will hopefully identify novel genes or deep-intronic sequence variants associated with this devastating disorder.

Note added in proof

During the processing of this article, we performed a MLPA analysis, using the SALSA MLPA P059 Dystonia probemix (MRC Holland,

Amsterdam, The Netherlands), of samples from patients 6–10. No *ATP1A3* CNVs were detected.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We thank the patients and their families for accepting to participate in this study. We acknowledge the valuable contribution of referring physicians, M.T. García-Silva and M.R. Domingo. M.V-P is supported by Fundació Institut de Recerca Vall d'Hebron and C.S. by MINECO (Spain). This work is supported by Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Catalunya, Spain), grants SGR 2009/0078 and SGR 2009/0971.

References

- Verret S, Steele JC. Alternating hemiplegia in childhood: a report of eight patients with complicated migraine beginning in infancy. *Pediatrics* Apr 1971;47(4):675–80.
- Bourgeois M, Aicardi J, Goutieres F. Alternating hemiplegia of childhood. *J Pediatr* May 1993;122(5 Pt 1):673–9.
- Guevara-Campos J, Gonzalez-de Guevara L, Urbaz-Cano J, Tinedo R, Villamizar M, Rojas L. Alternating hemiplegia of childhood treated as epilepsy. Two new cases. *Rev Neurol* Mar 16–31 2005;40(6):351–3.
- Rosewich H, Thiele H, Ohlenbusch A, Maschke U, Altmüller J, Frommolt P, et al. Heterozygous de-novo mutations in *ATP1A3* in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification study. *Lancet Neurol* Sep 2012;11(9):764–73.
- Heinzen EL, Swoboda KJ, Hitomi Y, Gurrieri F, Nicole S, de Vries B, et al. De novo mutations in *ATP1A3* cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet* Sep 2012;44(9):1030–4.
- Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, et al. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS One* 2013;8(2):e56120.
- Hoei-Hansen CE, Dali CI, Lyngby T, Duno M, Uldall P. Alternating hemiplegia of childhood in Denmark: clinical manifestations and *ATP1A3* mutation status. *Eur J Paediatr Neurol* Jan 2004;18(1):50–4.
- Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, et al. Genotype–phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* Feb 2014;82(6):482–90.
- de Vries B, Stam AH, Bekker F, van den Maagdenberg AM, Vanmolkot KR, Laan L, et al. *CACNA1A* mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia* Aug 2008;28(8):887–91.
- Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, et al. A novel mutation in the *ATP1A2* gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J Med Genet* Aug 2004;41(8):621–8.
- Swoboda KJ, Kanavakis E, Xaidara A, Johnson JE, Leppert MF, Schlesinger-Massart MB, et al. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine? A novel *ATP1A2* mutation. *Ann Neurol* Jun 2004;55(6):884–7.
- Rostein M, Doran J, Yang H, Ullner PM, Engelstad K, De Vivo DC. *Glut1* deficiency and alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* Dec 8 2009;73(23):2042–4.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* Feb 11 1988;16(3):1215.
- de Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT, Zaremba J, Liu L, Caton M, et al. Mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase alpha3 gene *ATP1A3* are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* Jul 22 2004;43(2):169–75.
- Rosewich H, Ohlenbusch A, Huppke P, Schlotawa L, Baethmann M, Carrilho I, et al. The expanding clinical and genetic spectrum of *ATP1A3*-related disorders. *Neurology* Mar 2014;82(11):945–55.
- Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* Aug 23 2005;65(4):529–34.
- Carreno O, Garcia-Silva MT, Garcia-Campos O, Martinez-de Aragon A, Cormand B, Macaya A. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo *CACNA1A* mutation. *Headache* Nov–Dec 2011;51(10):1542–6.
- De Grandis E, Stagnaro M, Biancheri R, Giannotta M, Gobbi G, Traverso M, et al. Lack of *SLC2A1* (glucose transporter 1) mutations in 30 Italian patients with alternating hemiplegia of childhood. *J Child Neurol* Jul 2013;28(7):863–6.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene *CACNA1A*. *Cell* Nov 1 1996;87(3):543–52.
- Cricchi F, Di Lorenzo C, Grieco GS, Rengo C, Cardinale A, Racaniello M, et al. Early-onset progressive ataxia associated with the first *CACNA1A* mutation identified within the I–II loop. *J Neurol Sci* Mar 15 2007;254(1–2):69–71.
- Serra SA, Cuenca-Leon E, Llobet A, Rubio-Moscardo F, Plata C, Carreno O, et al. A mutation in the first intracellular loop of *CACNA1A* prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jan 26 2009;107(4):1672–7.

- [22] Kim JH, Sizov I, Dobretsov M, von Gersdorff H. Presynaptic Ca²⁺ buffers control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the alpha3 Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *Nat Neurosci* Feb 2007;10(2):196–205.
- [23] Ullate-Campos A, Fons C, Artuch R, Castejón E, Martorell L, Ozelius L, et al. Alternating hemiplegia of childhood with a de novo mutation in ATP1A3 and changes in SLC2A1 responsive to a ketogenic diet. *Pediatr Neurol* Apr 2014;50(4):377–9.
- [24] Roubergue A, Roze E, Vuillaumier-Barrot S, Fontenille MJ, Méneret A, Vidailhet M, et al. The multiple faces of the ATP1A3-related dystonic movement disorder. *Mov Disord* Sep 2013;28(10):1457–9.
- [25] Sasaki M, Sakuma H, Fukushima A, Yamada K, Ohnishi T, Matsuda H. Abnormal cerebral glucose metabolism in alternating hemiplegia of childhood. *Brain Dev* Jan 2009;31(1):20–6.

C. ANNEX 1

SEQÜENCIACIÓ DEL GEN *PRRT2* EN LA DISCINÈSIA PAROXÍSTICA CINESIGÈNICA

RESUM

La discinèsia paroxística cinesigènica (DPC) és un trastorn neurològic del moviment. El seu origen genètic va ser descrit l'any 2011 en una publicació on es va identificar que les mutacions en el gen *PRRT2* eren la causa predominant de la DPC.

L'objectiu d'aquest estudi es va centrar en identificar mutacions en el gen *PRRT2* en una cohort de 10 pacients espanyols no emparentats diagnosticats amb DPC.

Els 3 exons del gen *PRRT2* van ser amplificats mitjançant PCR i van ser seqüenciats mitjançant seqüenciació Sanger.

Es van trobar 3 mutacions diferents en el gen *PRRT2* en 8 dels 10 pacients (incloent tots els casos familiars). Concretament, es va trobar la mutació c.649dupC en heterozigosi en 5 dels pacients, la mutació c.219_220delGA en heterozigosi en un pacient i la mutació c.649dupC i la mutació c.649delC en un altre pacient.

Es van trobar 3 mutacions diferents en el gen *PRRT2* en 8 dels 10 pacients (incloent tots els casos familiars). Concretament, es va trobar la mutació c.649dupC en heterozigosi en 5 dels pacients, la mutació c.219_220delGA en heterozigosi en un pacient i la mutació c.649dupC i la mutació c.649delC en un altre pacient.

Aquest estudi confirma la presència de mutacions en el gen *PRRT2* en el 80% dels casos analitzats. En aquest cribratge s'han descrit per primera vegada tant la mutació c.219_220delGA com la presència de la mutació c.649dupC i la mutació c.649delC en un mateix pacient.

REFERÈNCIA

Macaya A., Molina B., Pérez-Dueñas B., Rodríguez-Palmero A., Vila-Pueyo M., Raspall-Chaure M.A (2013) Trastornos neurológicos paroxísticos asociados a mutaciones en *PRRT2*. Presentació en format pòster a la "Reunió Científica conjunta de la AINP i la SENEP" realitzat a València.

OBJECTIU DE L'ESTUDI

La discinèsia paroxística cinesigènica (DPC) és un trastorn neurològic del moviment caracteritzat pel desenvolupament d'episodis de moviments involuntaris provocats per moviments voluntaris sobtats. L'any 2011 es va identificar la causa genètica de la DPC, la qual es va relacionar amb la presència de mutacions en el gen *PRRT2*. Des de llavors s'han publicat nombrosos estudis genètics de cohorts de pacients de DPC, indicant que existeixen diverses mutacions patogèniques en el gen *PRRT2*. Aquests estudis demostren també que existeix una mutació molt recurrent en totes les cohorts: la duplicació c.649dupC. En relació a la proteïna codificada pel gen *PRRT2* se'n desconeix la seva funció, tot i que se sap que es tracta d'una proteïna transmembranaral que s'expressa al sistema nerviós central.

L'objectiu d'aquest treball va ser realitzar un estudi mutacional del gen *PRRT2* en 10 pacients diagnosticats per la DPC, 5 d'ells eren casos amb familiars afectes i els altres 5 eren casos esporàdics.

MATERIALS I MÈTODES

Es va extreure ADN genòmic de sang perifèrica dels 10 individus afectes de DPC mitjançant la tècnica de Salting-out. A partir de l'ADN genòmic es van amplificar, mitjançant PCR, els 3 exons del gen *PRRT2* (incloent les regions adjacents) i les regions 5' i 3'-UTR. Es van utilitzar els encebadors i condicions experimentals especificats a la taula 12.

Els productes de PCR es van purificar i es van preparar mitjançant el kit "ABI BigDye Terminator cycle v3.1" per a procedir a la seva seqüenciació. Les seqüències obtingudes es van analitzar mitjançant el seqüenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) i es van comparar amb la seqüència de referència del gen *PRRT2* (número d'accés a GenBank BC011405.1).

En els casos on el cribratge mutacional va resultar positiu, es va tornar a amplificar i seqüenciar l'exó on hi havia la mutació per tal de poder confirmar-la i descartar falsos positius. A més a més, en els casos en què es disposava de l'ADN dels progenitors, aquest s'analitzava per a determinar si la mutació era *de novo* o si bé s'havia heretat dels progenitors.

EXÓ	SEQÜÈNCIA DE L'ENCEBADOR (5'À3')	LLARGADA DEL PRODUCTE AMPLIFICAT (PB)	TEMPERATURA D'UNIÓ (°C)
5'UTR +1	Fw -CCGCTGTCTCTGCTATTCCA Rv -AGCTGGGAGCCACAGCAG	984	66
2 + 3 + 3'UTR	Fw -TCCACCTGATCCCTTCTGG Rv -CAGGCTCCCTTGTCCTTAG	500	58

Taula 12. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *PRRT2*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors. *Fw* indica forward (encebador directe) i *Rv* reverse (encebador invers).

RESULTATS

Dels 10 pacients analitzats, es van trobar 3 mutacions diferents en el gen *PRRT2* en 8 d'ells. Concretament, es van trobar mutacions en els 5 casos familiars, en canvi 2 dels casos esporàdics van resultar negatius per al cribratge mutacional.

Els pacients A, B, C, H i J presentaven la mutació c.649dupC en heterozigosi, la qual correspon a la mutació més prevalent associada a DPC. El pacient D presentava la mutació c.219_220delGA en heterozigosi, la qual no havia estat prèviament descrita. El pacient E presentava la mutació c.649dupC i la mutació c.649delC, tot i que ambdues mu-

tacions havien estat prèviament descrites, aquest és el primer cas descrit que presenta ambdues mutacions alhora. Finalment, el pacient F presentava la mutació c.649delC en heterozigosi.

A la següent figura es representen els pedigrís dels 10 individus inclosos en aquest estudi i els electroferogrames de les mutacions trobades. Tal i com s'especifica al requadre de la figura, alguns dels pacients presentaven d'altres característiques clíniques, incloent l'epilèpsia (tant la infantil com la de l'adult), el trastorn obsessivocompulsiu i l'autisme.

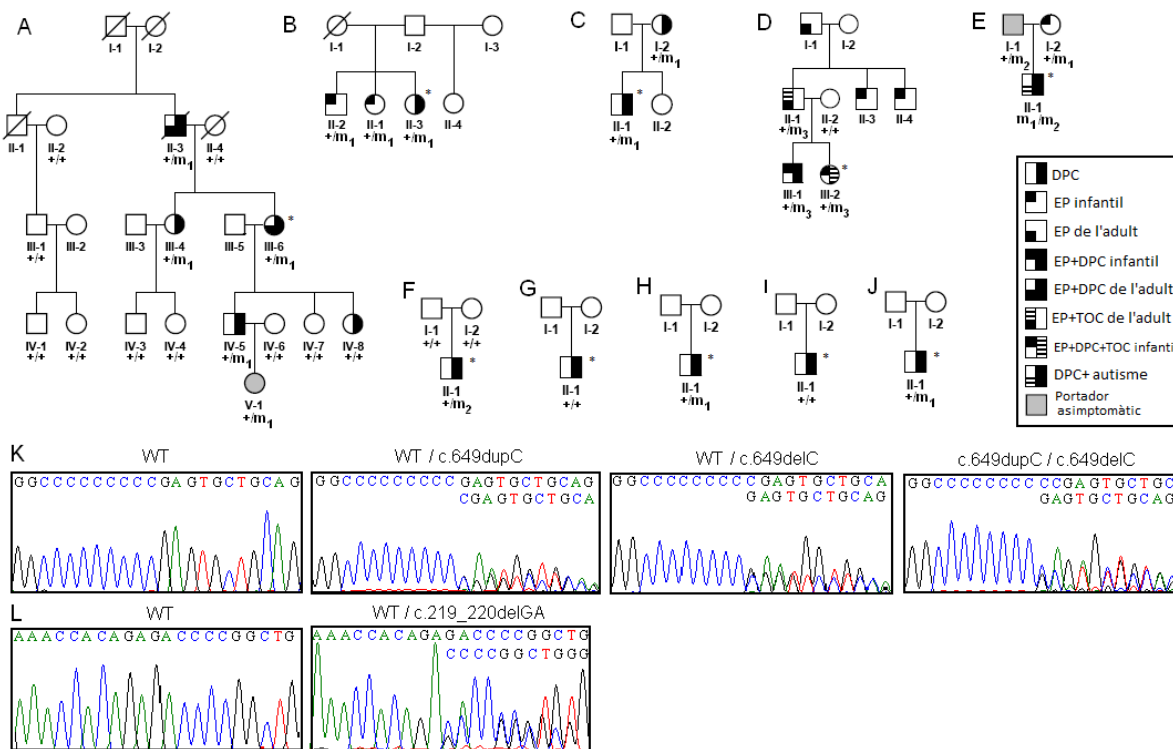


Figura 13. Pedigrís pertanyents als individus amb DPC seqüenciats pel gen *PRRT2* i electroferogrames de les regions genòmiques que inclouen les mutacions trobades. A, B, C, D i E: pedigrís dels casos familiars. F, G, H, I i J: pedigrís dels casos esporàdics. K: electroferogrames de les mutacions trobades a la posició genòmica c.649; concretament la mutació c.649dupC (m1) en heterozigosi, la mutació c.649delC (m2) en heterozigosi i les mutacions c.649dupC i c.649delC en heterozigosi (m1/m2). L: electroferogrames de la mutació trobada a la posició c.219_220 (m3). EP: epilèpsia, TOC: trastorn obsessivocompulsiu, WT: seqüència sense mutacions [de l'anglès wild-type].

A la taula 13 es resumeixen els resultats de l'anàlisi mutacional dels 10 pacients de DPC inclosos en aquest estudi.

PACIENT	DPC FAMILIAR	MUTACIÓ			
		Trobada	Exó	cADN	Proteïna
A	Sí	Sí	1	c.649dupC	p.R217PfsX8
B	Sí	Sí	1	c.649dupC	p.R217PfsX8
C	Sí	Sí	1	c.649dupC	p.R217PfsX8
D	Sí	Sí	1	c.219_220delGA	p.E73fsX60
E	Sí	Sí	1	c.649dupC/c.649delC	p.R217PfsX8 / p.R217EfsX12
F	No	Sí	1	c.649delC	p.R217EfsX12
G	No	No	-	-	-
H	No	Sí	1	c.649dupC	p.R217PfsX8
I	No	No	-	-	-
J	No	Sí	1	c.649dupC	p.R217PfsX8

Taula 13. Taula resum dels resultats de l'anàlisi mutacional dels 10 pacients de DPC.

D. ANNEX 2

SEQÜENCIACIÓ I ESTUDI DE VARIACIONS EN EL NÚMERO DE CÒPIES DEL GEN *SLC2A1* EN LA SÍNDROME DE LA DEFICIÈNCIA DEL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT1

RESUM

La síndrome de la deficiència del transportador de glucosa de tipus 1 (GLUT1DS) és una malaltia neurològica causada per una deficiència en el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica que ha estat relacionada amb la presència de mutacions en el gen *SLC2A1*, el qual codifica pel transportador de glucosa situat a la barrera hematoencefàlica.

L'objectiu d'aquest estudi es va centrar en identificar mutacions i variacions en el número de còpies en el gen *SLC2A1* en una cohort de 5 pacients espanyols no emparentats diagnosticats amb GLUT1DS.

Els 10 exons del gen *SLC2A1* van ser amplificats mitjançant PCR i van ser seqüenciats mitjançant seqüenciació Sanger. A més a més, es va fer una anàlisi de la variació en el nombre de còpies del gen *SLC2A1* mitjançant la tècnica MLPA.

Es van trobar mutacions *de novo* en 3 dels 5 pacients analitzats: una mutació puntual de canvi de sentit (c.667C>T), una deleció de tot l'exó 1 i una microdeleció de 2 nucleòtids (c.710_711delGA).

Aquest estudi confirma la presència de mutacions en el gen *SLC2A1* en més de la meitat dels pacients de GLUT1DS analitzats. La presència de delecions en 2 dels 5 pacients analitzats indica l'interès en cercar aquest tipus de mutacions en les cohorts de pacients de GLUT1DS.

REFERÈNCIA

Flotats-Bastardes M., Quiroz A., Vila-Pueyo M., Raspall-C-haure M., Domingo R., Macaya A (2013) Glut-1 deficiency: a clinical and genetical study of 5 patients. Presentació en format pòster al "12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism" realitzat a Barcelona.

OBJECTIU DE L'ESTUDI

La síndrome de la deficiència del transportador de glucosa de tipus 1 (GLUT1DS) és una malaltia neurològica causada per una deficiència en el transport de glucosa a través de la barrera hematoencefàlica. Aquesta síndrome ha estat àmpliament relacionada amb mutacions en el gen *SLC2A1*, el qual codifica pel transportador de glucosa situat a la barrera hematoencefàlica. El tractament actual d'aquesta malaltia consisteix en receptar una dieta cetogènica al pacient. Aquest tractament es basa en el fet que les cetones tenen una via d'entrada a cervell diferent de la glucosa: enlloc d'usar el transportador de glucosa tipus 1, utilitzen el transportador MCT1 el qual permet l'entrada de les cetones a cervell mitjançant difusió facilitada. Així s'obté l'energia necessària per al correcte funcionament de l'activitat cerebral a partir de les cetones. Com abans s'iniciï la dieta cetogènica, més probabilitat hi ha que els símptomes de la malaltia siguin més lleus.

L'objectiu d'aquest treball va ser realitzar un estudi mutacional del gen *SLC2A1* en 5 pacients diagnosticats per la síndrome de la deficiència del transportador de glucosa de tipus 1 (GLUT1DS).

MATERIALS I MÈTODES

Es va extreure ADN genòmic de sang perifèrica dels 5 individus afectes de GLUT1DS mitjançant la tècnica de Salting-out (la mateixa tècnica utilitzada als articles 1 i 2). A partir de l'ADN genòmic es van amplificar mitjançant PCR els 10 exons del gen *SLC2A1* (incloent les regions adjacents), les regions 5' i 3'-UTR i la regió promotora. Es van utilitzar els encebadors i condicions experimentals representats a la taula 14.

EXÓ	SEQÜÈNCIA DE L'ENCEBADOR (5'À3')	LLARGADA DEL PRODUCTE AMPLIFICAT (PB)	TEMPERATURA D'UNIÓ (°C)
5'UTR +1	Fw -CCTAGTGCACCGAAGTCACC Rv -CTAGATCCGAAGCCCATCC	850	57.5
2	Fw -CACAGAAACTTGCCAGTCCA Rv -ACTGTGGGCATGTGTGATGT	249	55
3+4	Fw -CAAGGGGAAAGGAAAAGGAA Rv -GCTGCTACTCTGCCACAAGA	991	57
5+6	Fw -GAAGCAGCAGCTGACACAAA Rv -ACACTTGACCAGAGGGCTTG	596	61
7+8	Fw -CCCACATCCACTGCTACAGA Rv -TATGAAGCCCAGGCAAATC	516	57
9	Fw -TGCTCTGGCCTCTGTAGCTT Rv -TTCCTCCTCAGCATGATTCC	392	57
10 + 3'UTR	Fw -TCAAAGGCCCAAAGGTAAAG Rv -GGTCCAGCCCTACAGATTAGC	682	55

Taula 14. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *SLC2A1*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors. *Fw* indica *forward* (encebador directe) i *Rv* *reverse* (encebador invers).

Els productes de PCR es van purificar i es van preparar mitjançant el kit "ABI BigDye Terminator cycle v3.1" per a procedir a la seva seqüenciació. Les seqüències obtingudes es van analitzar mitjançant el seqüenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) i es van comparar amb la seqüència de referència del gen *SLC2A1* (número d'accés a GenBank NM_006516).

En els casos on el cribratge mutacional resultava negatiu, es va procedir a realitzar un estudi de variacions en el número de còpies (cerca d'insercions o delecions grans) del gen mitjançant la tècnica "Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" (MLPA), la mateixa tècnica utilitzada als articles 1 i 2. En aquest cas vam utilitzar els kits "SALSA MLPA probemix P138 SLC2A1" i "SALSA MLPA EK1 reagent kit" (MRC-HOLLAND) seguint les instruccions del fabricant. Els resultats es van analitzar mitjançant el software GeneMapper (Applied Biosystems) i Excel.

En els casos on el cribratge mutacional resultava positiu, es tornava a amplificar i seqüenciar l'exó on hi havia la

mutació o, en els casos on es descrivien insercions o delecions, es tornava a realitzar el MLPA. A més a més, també s'analitzava l'ADN dels progenitors per a determinar si la mutació era *de novo* o si bé s'havia heretat dels progenitors.

RESULTATS

Dels 5 pacients analitzats, es van trobar 3 mutacions diferents. El pacient 444 presentava la mutació *de novo* c.667C>T; la qual havia estat prèviament descrita en un altre pacient de GLUT1DS. El pacient NP0063 presentava una deleció *de novo* de tot l'exó 1. El pacient NP0085 presentava la mutació *de novo* c.710_711delGA. Els pacients NP0061 i NP0100 van resultar negatius per al cribratge mutacional.

A la següent figura es representa el transportador de glucosa GLUT1. En aquesta representació, es pot veure que consta de 12 dominis transmembranals, 7 dominis citoplasmàtics i 6 dominis extracel·lulars. En aquesta figura també s'hi indica la posició de les 3 mutacions trobades en aquest estudi i els electroferogrames corresponents.

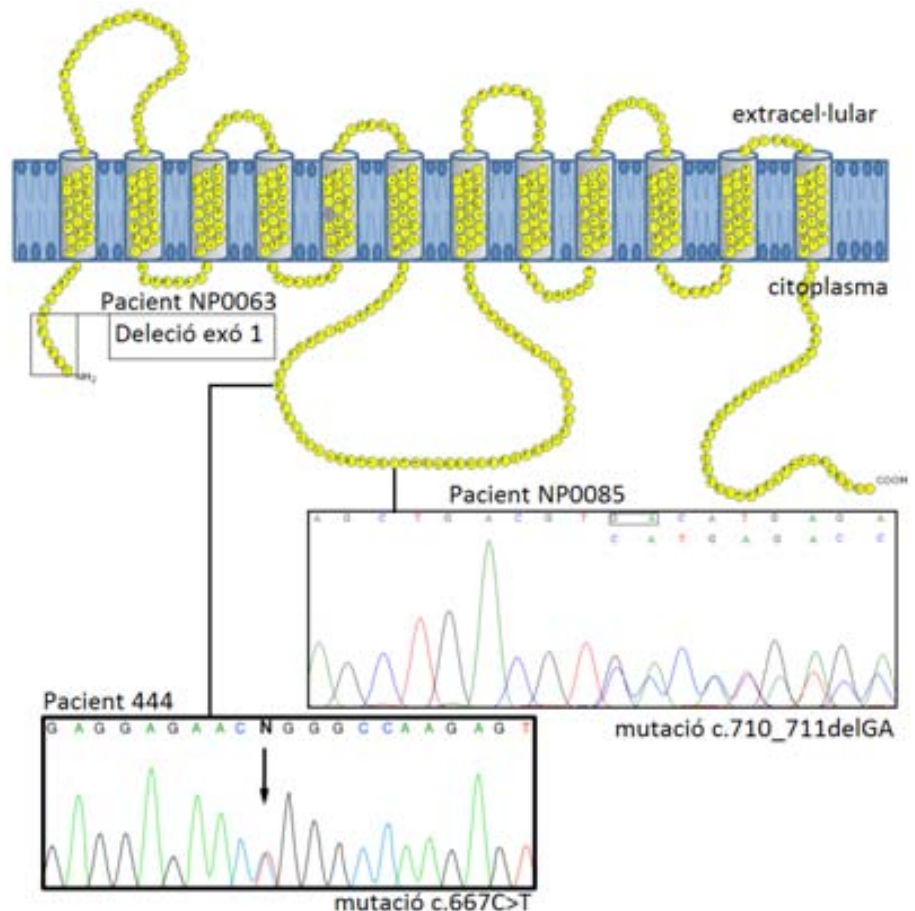


Figura 14. Representació del transportador de glucosa GLUT1 i de les mutacions trobades en 3 pacients de GLUT1DS. Imatge adaptada de Urbizu et al., A novel *SLC2A1* mutation causing paroxysmal exercise-induced dyskinesia in twin Spanish patients, Pòster presentat a European Human Genetics Conference 2009.

La figura 15 inclou els resultats del MLPA del pacient NP0063 i dels seus progenitors.

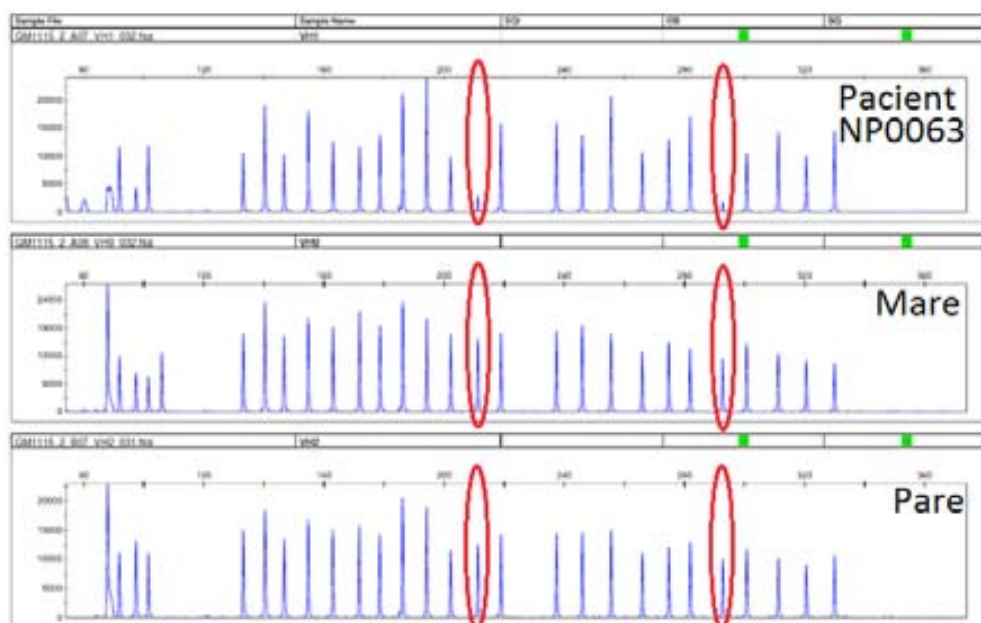


Figura 15. Resultats del MLPA del gen *SLC2A1* del pacient NP0063 i dels seus progenitors. Els cercles vermells indiquen els pics de senyal corresponents a l'exó 1. Es pot veure que en el cas del pacient la intensitat de la senyal és molt més baixa comparada amb la dels progenitors.

A la taula 15 es resumeixen els resultats de l'anàlisi mutacional dels 5 pacients de GLUT1DS inclosos en aquest estudi.

PACIENT	SEQÜENCIACIÓ	MLPA	MUTACIÓ			
			EXÓ	cADN	Proteïna	DE NOVO
444	Sí	No	5	c.667C>T	p.Arg223Trp	Sí
NP0061	Sí	Sí	-	-	-	-
NP0063	Sí	Sí	Delecio exó 1	-	-	Sí
NP0085	Sí	No	6	c.710_711delGA	p.Val237Valfs*2	Sí
NP0100	Sí	No	-	-	-	-

Taula 15. Taula resum dels resultats de l'anàlisi mutacional dels 5 pacients de GLUT1DS.

E. ANNEX 3

CRIBRATGE GENÈTIC DELS GENS *CACNA1A* I *ATP1A2* EN LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA: ESTUDIS CLÍNICS, GENÈTICS I FUNCIONALS

RESUM

La migranya hemiplègica (MH) és un subtipus rar i greu de migranya amb herència autosòmica dominant, caracteritzada per la presència d'aures que presenten debilitat motora. S'han identificat mutacions en 4 gens (*CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* i *PRRT2*) tant en casos familiars com esporàdics. Aquesta malaltia pot acompanyar-se d'atàxia permanent, crisis epilèptiques, retard mental i atròfia cerebelosa progressiva, en els casos més greus. En aquest estudi es presenta un cribratge mutacional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en 18 pacients amb MH. També es presenta un estudi del nombre de còpies del gen *CACNA1A* realitzat mitjançant aproximacions quantitatives.

Els resultats d'aquest estudi van permetre identificar 4 mutacions de canvi de sentit, prèviament descrites, en el gen *CACNA1A* (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln i p.Thr666Met) i 2 mutacions de canvi de sentit el gen *ATP1A2*, la mutació p.Ala606Thr que havia estat prèviament descrita i la mutació nova p.Glu825Lys. No es va trobar cap variant estructural.

Aquest cribratge genètic va permetre la identificació de més del 30% de les variants patogèniques, totes presents en heterozigosi. Les conseqüències funcionals de la mutació p.Thr501Met del gen *CACNA1A* i de la mutació p.Glu825Lys al gen *ATP1A2* van ser analitzades mitjançant estudis electrofisiològics, assajos de viabilitat cel·lular o anàlisis Western blot. Els resultats d'aquest estudi suggereixen que ambdues mutacions són les causants de la MH en els pacients portadors d'aquestes.

REFERÈNCIA

Carreno O, Corominas R, Serra SA, Sintas C, Fernandez-Castillo N, [Vila-Pueyo M](#), Toma C, Gene GG, Pons R, Llana M, Sobrido MJ, Grinberg D, Valverde MA, Fernandez-Fernandez JM, Macaya A, Cormand B (2013) Screening of *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic, and functional studies. *Mol Genet Genomic Med* 1:206-222.

ORIGINAL ARTICLE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Keywords

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

Correspondence

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

Funding Information

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

Abstract

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

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

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

doi: 10.1002/mgg3.24

Introduction

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

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

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

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

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

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

Materials and Methods

Patients

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

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

Sampling and mutation screening

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

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

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

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

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

DNA constructs and site-directed mutagenesis

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

A full-length human *ATP1A2* ouabain-resistant cDNA clone (α_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 (α_2 _oua_825Lys) was introduced in a α_2 _oua_wt clone with the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA).

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

Functional analysis of CACNA1A

Heterologous expression and electrophysiology

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

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

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

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

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

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

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

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

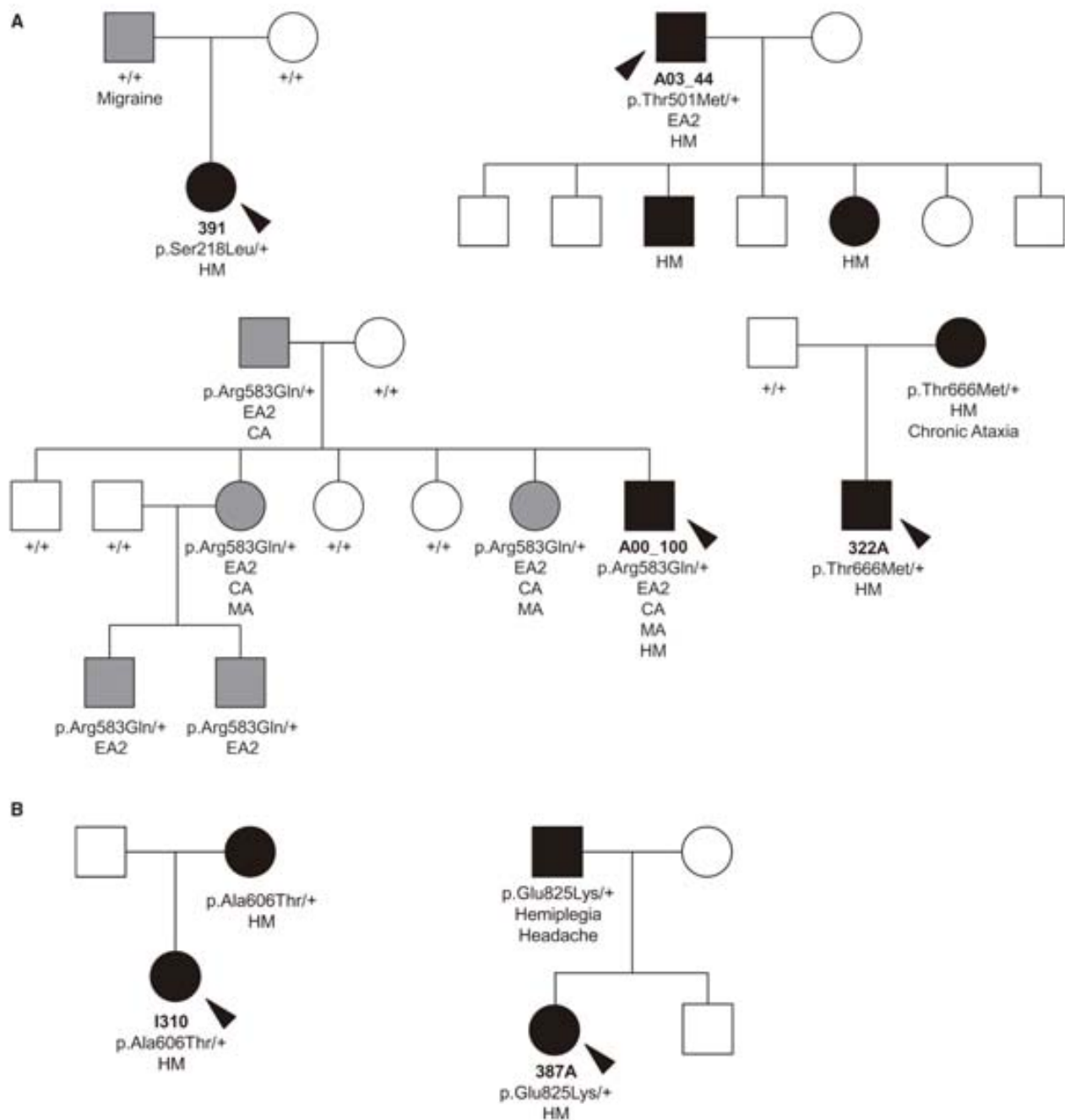


Figure 1. Pedigrees of patients with the identified gene variants. (A) Mutations in the *CACNA1A* gene. (B) Mutations in the *ATP1A2* gene. Affected individuals are denoted by solid symbols; hemiplegic migraine (HM) in black and other phenotypes in gray; squares indicate males and circles females. Probands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

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

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

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

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

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

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

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

Statistics

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

Functional analysis of ATP1A2

Cell viability assay

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

Western blot analysis

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

Statistics

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

Results

Clinical data

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

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

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

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

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

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

Genetic analysis

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

healthy Greek individuals. One of the changes, p.Ser218-Leu, was present in the affected sib, but not in her parents, indicating a de novo origin (Fig. 1A). False paternity was excluded by genotyping 16 polymorphic microsatellite markers in all the family members (data not shown).

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

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

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

Functional studies

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

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

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

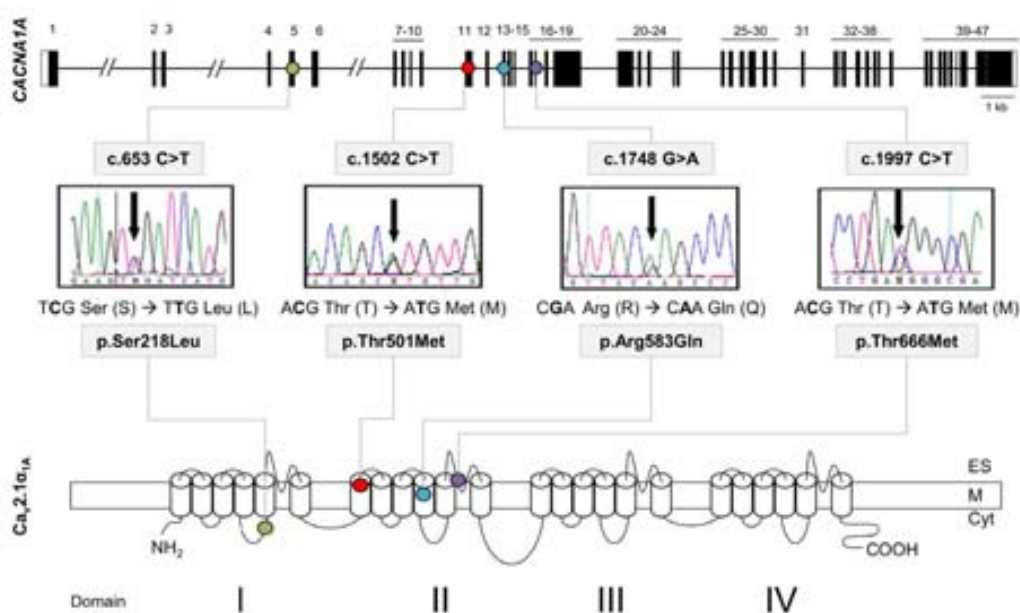
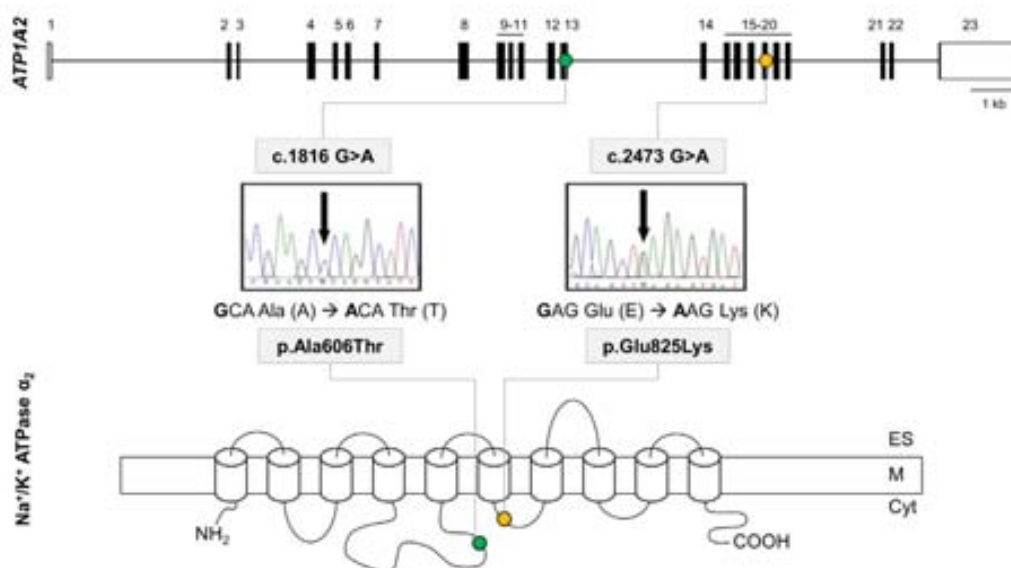
A **CACNA1A**B **ATP1A2**

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

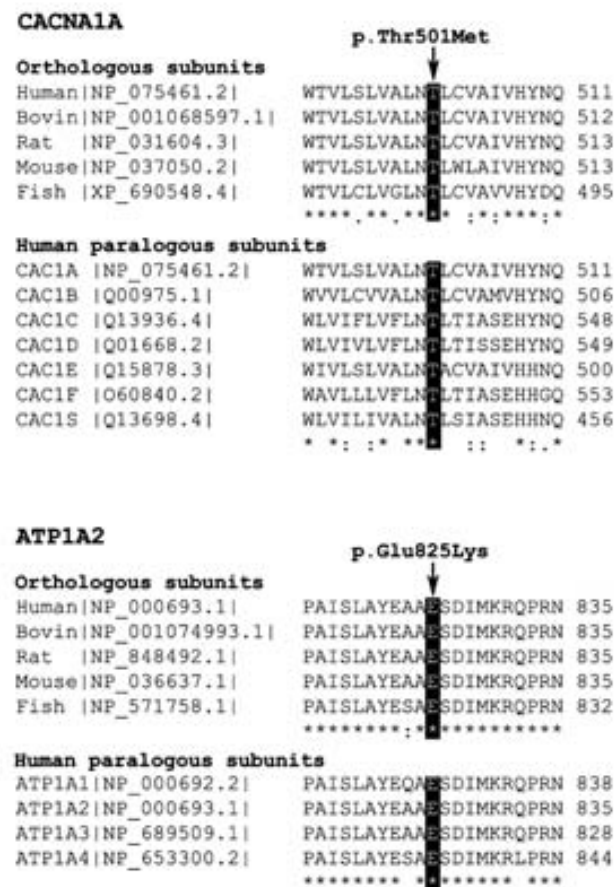


Figure 3. Protein alignment performed with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) (Chenna et al. 2003). On top, the CACNA1A Thr501 residue is conserved in all the human calcium channel $\alpha 1$ subunits studied (CACNA1A, B, C, D, E, F, and S) and in the orthologous CACNA1A proteins of several organisms. Bottom, the ATP1A2 Glu825 residue is conserved in the four human ATP1 paralogous subunits (ATP1A1, A2, A3, and A4) and in orthologous ATP1A2 proteins of several organisms. Key: "*" identical residues; ":" conserved substitutions (same amino acid group); "." semi-conserved substitution (similar shapes). Human: *Homo sapiens*; Bovine: *Bos taurus*; Rat: *Rattus norvegicus*; Mouse: *Mus musculus*; Fish (Zebrafish): *Danio rerio*.

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

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

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

ATP1A2 (p.Glu825Lys): Ouabain resistance survival assays

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

HeLa cells transfected with the $\alpha 2_{oua_825Lys}$ construction showed a 10% survival rate, compared with cells transfected with $\alpha 2_{oua_WT}$ ($P < 0.0003$) (Fig. 5A). Western blot analysis of HeLa extracts obtained after transfection with the mutant and WT constructions showed a diminished amount of 825Lys protein compared with the WT, indicating that the altered protein may be unstable (Fig. 5B).

Discussion

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

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

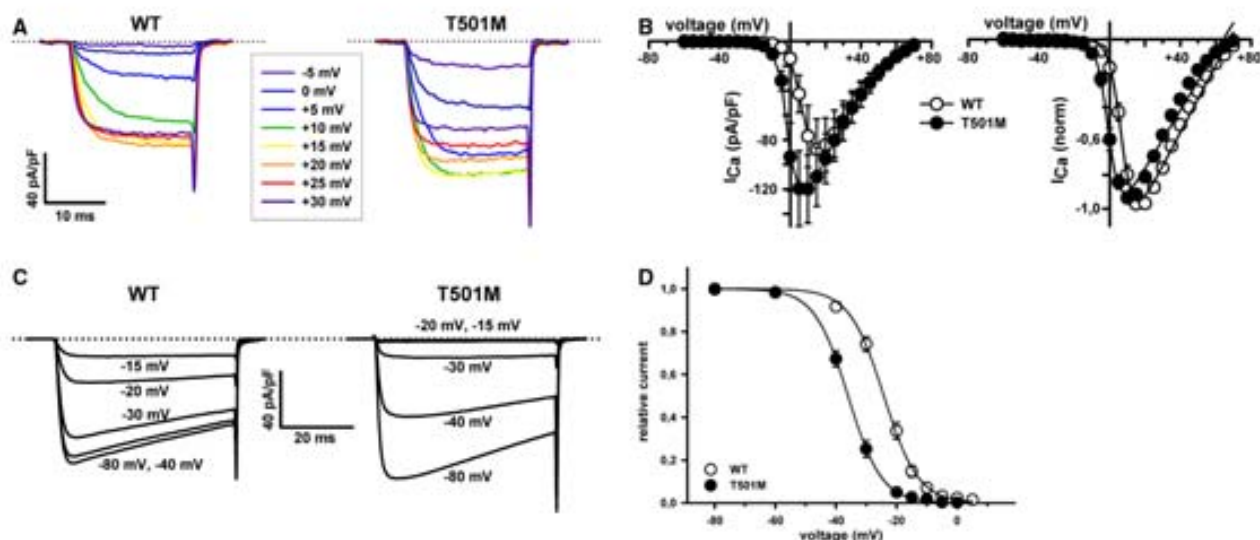


Figure 4. Mutation p.Thr501Met affects activation and inactivation properties of heterologously expressed P/Q channels. (A) Current traces illustrating voltage dependence of WT (left) and p.Thr501Met (right) P/Q channels, in response to 20 msec voltage pulses. Dotted lines in the current traces indicate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

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

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

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

CACNA1A screening

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

p.Ser218Leu

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

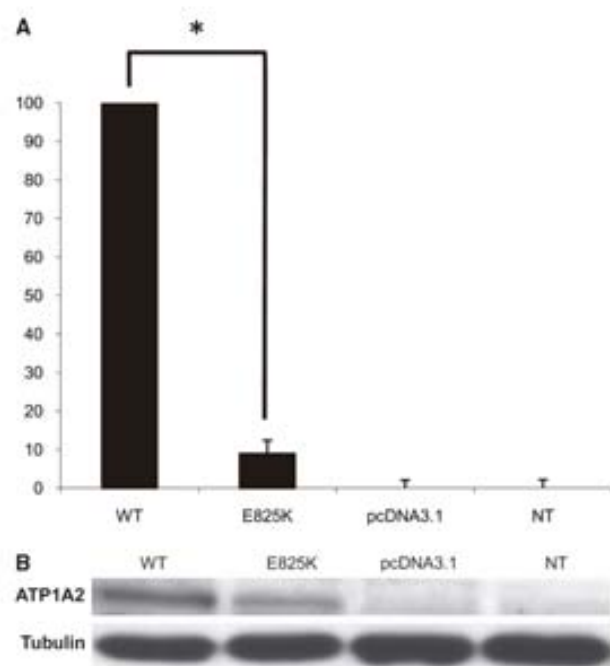


Figure 5. (A) Viability of HeLa cells transfected with the mutant *ATP1A2* cDNA (E825K) normalized to the viability of cells transfected with the ouabain-resistant wild-type *ATP1A2* cDNA (WT). NT, untransfected cells; pcDNA3.1, cells transfected with the empty vector. Four independent experiments were performed, each with triplicate measurements. The * symbol indicates the existence of significant differences between the p.Glu825Lys and the WT *ATP1A2* constructs ($P < 0.0003$). (B) Western blot assay of the different protein extracts using anti-myc and anti-tubulin antibodies. The molecular weight of the Na⁺/K⁺-ATPase $\alpha 2$ subunit and tubulin are indicated. The constructs with the *ATP1A2* ouabain-resistant cDNA carry the myc tag. The clone with the mutation displayed diminished band intensity.

other missense changes, is thought to explain the severe clinical outcome observed in the patients carrying this mutation. Studies with a mouse model provide evidence that p.Ser218Leu mutations directly affect Ca²⁺-dependent facilitation and synaptic plasticity (Adams et al. 2010).

p.Arg583Gln

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

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

p.Thr666Met

This is also a prevalent mutation that has previously been found in 24 FHM or SHM probands (Ophoff et al. 1996; Ducros et al. 1999; Friend et al. 1999; Terwindt et al. 2002; Wada et al. 2002; Kors et al. 2003; Thomsen et al. 2007; Freilinger et al. 2008; Yabe et al. 2008; Riant et al. 2010a). Functional studies in heterologous systems showed a gain of function through the following mechanisms: a decrease in the recovery after inactivation (Kraus et al. 1998) and increased Ca²⁺ influx through the channel in a broad voltage range around the threshold of activation, which was also reduced (Tottene et al. 2002).

p.Thr501Met

This change, found in patient #A03_044 with FHM, nystagmus, and episodic and progressive ataxia, has been described in another family with EA2 (Mantuano et al. 2010) and in a case with bouts of episodic ataxia and confusion but no hemiplegia, in association with vermian cerebellar atrophy (Cleves et al. 2009). This is the second reported mutation in the S1 segment in any domain of the α_{1A} subunit in patients with HM. As the previously described p.Tyr1245Cys (Serra et al. 2009), p.Thr501Met alters channel activation and inactivation. It promotes channel activity by shifting the current activation curve to lower voltages (-9 mV) and increasing Ca²⁺ current density to a range of voltages that neurons can encounter during action potential firing. p.Thr501Met also shifts voltage-dependent steady-state inactivation to less depolarized voltages (-15 mV). These results further support an important role of the S1 segments in the function of voltage sensors leading to channel gating (Campos et al. 2007).

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

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

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

ATP1A2 screening

p.Ala606Thr

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

p.Glu825Lys

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

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

Unidentified mutations/genes

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

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

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

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

Acknowledgments

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

Conflict of Interest

None declared.

References

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

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

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

- Thomsen, L. L., M. Kirchmann, A. Bjornsson, H. Stefansson, R. M. Jensen, A. C. Fasquel, et al. 2007. The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 130:346–356.
- Tombola, F., M. M. Pathak, and E. Y. Isacoff. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:23–52.
- Tottene, A., T. Fellin, S. Pagnutti, S. Luvisetto, J. Striessnig, C. Fletcher, 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. USA* 99:13284–13289.
- Tottene, A., F. Pivotto, T. Fellin, T. Cesetti, A. M. van den Maagdenberg, and D. Pietrobon. 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.* 280:17678–17686.
- Tottene, A., R. Conti, A. Fabbro, D. Vecchia, M. Shapovalova, M. Santello, et al. 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61:762–773.
- Vahedi, K., C. Depienne, D. Le Fort, F. Riant, P. Chaine, O. Trouillard, et al. 2009. Elicited repetitive daily blindness: a new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations. *Neurology* 72:1178–1183.
- Vanmolkot, K. R., E. E. Kors, J. J. Hottenga, G. M. Terwindt, J. Haan, W. A. Hoefnagels, et al. 2003. Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene *ATP1A2* associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann. Neurol.* 54:360–366.
- Veneziano, L., S. Guida, E. Mantuano, P. Bernard, P. Tarantino, L. Boccone, 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.* 276:31–37.
- de Vries, B., T. Freilinger, K. R. Vanmolkot, J. B. Koenderink, A. H. Stam, G. M. Terwindt, et al. 2007. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. *Neurology* 69:2170–2176.
- de Vries, B., A. H. Stam, F. Beker, A. M. J. M. van den Maagdenberg, K. R. J. Vanmolkot, L. A. E. M. Laan, et al. 2008. *CACNA1A* mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia* 28:887–891.
- de Vries, B., R. R. Frants, M. D. Ferrari, and A. M. van den Maagdenberg. 2009. Molecular genetics of migraine. *Hum. Genet.* 126:115–132.
- Wada, T., N. Kobayashi, Y. Takahashi, T. Aoki, T. Watanabe, and S. Saitoh. 2002. Wide clinical variability in a family with a *CACNA1A* T666m mutation: hemiplegic migraine, coma, and progressive ataxia. *Pediatr. Neurol.* 26:47–50.
- Wan, J., H. Mamsa, J. L. Johnston, E. L. Spriggs, H. S. Singer, D. S. Zee, et al. 2011. Large genomic deletions in *CACNA1A* cause episodic ataxia type 2. *Front. Neurol.* 2:51.
- Weiss, N., A. Sandoval, R. Felix, A. Van den Maagdenberg, and M. De Waard. 2008. The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes de/inhibition of Ca(v)2.1 calcium channels during direct G-protein regulation. *Pflugers Arch.* 457:315–326.
- Wessman, M., G. M. Terwindt, M. A. Kaunisto, A. Palotie, and R. A. Ophoff. 2007. Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol.* 6:521–532.
- Wood, H. 2012. Expanding the spectrum of neurological disorders associated with *PRRT2* mutations. *Nat. Rev. Genet.* 8:657.
- Xu, G., R. A. Farley, D. J. Kane, and L. D. Faller. 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., M. Kitagawa, Y. Suzuki, K. Fujiwara, T. Wada, T. Tsubuku, et al. 2008. Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. *J. Neurol.* 255:1541–1544.
- Yamazaki, S., K. Ikeno, T. Abe, J. Tohyama, and Y. Adachi. 2011. Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome associated with *CACNA1A* S218L mutation. *Pediatr. Neurol.* 45:193–196.
- Zangaladze, A., A. A. Asadi-Pooya, A. Ashkenazi, and M. R. Sperling. 2010. Sporadic hemiplegic migraine and epilepsy associated with *CACNA1A* gene mutation. *Epilepsy Behav.* 17:293–295.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. CNV study design using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) approaches. Symbols (▲) indicate the exons covered by each assay. The MLPA kit allowed inspection of 24 exons. The analysis software Coffalyser v8 was used to evaluate the possible presence of CNVs, considering a deletion when the ratio was under 0.7 and a duplication when it was over 1.3. For QMPSF, we used four sets of primer pairs covering 16 additional exons. A reference fragment from the *RNF20* gene was coamplified in each multiplex. Furthermore, two individuals with deletions corresponding to exons 20–47 and 32–47 of *CACNA1A* were also included in every assay as positive controls. Data were analyzed using the PeakScanner™ v1.0 software (Applied Biosystems), and the final ratios for each exon were expressed using the following formula: (height of the peak corresponding to the tested fragment for the patient/

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

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

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

F. ANNEX 4

SEQÜENCIACIÓ DEL GEN *SCN1A* EN MIGRANYA HEMIPLÈGICA

RESUM

En aquest estudi es va realitzar un cribratge mutacional del gen *SCN1A* en la cohort de pacients de migranya hemiplègica (MH) presentada a l'Annex 3 que havien resultat negatius en l'estudi mutacional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2*. A més a més, es van afegir nous pacients de MH que no havien pogut ser inclosos en l'estudi anterior.

Aquest cribratge genètic va permetre identificar una mutació nova de canvi de sentit (c.4981T>C) en un dels 20 pacients seqüenciats. La baixa freqüència de mutacions en el gen *SCN1A* en les cohorts de pacients de MH implica una molt baixa eficiència en la seqüenciació d'aquest gen en aquesta cohort de pacients.

OBJECTIU DE L'ESTUDI

L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar si en una cohort de 20 pacients de MH, que incloïa els pacients que havien resultat negatius pel cribratge mutacional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* presentat a l'annex 3 junt amb nous pacients de MH, tenien mutacions en el gen *SCN1A*. Els 3 gens citats estan associats a MH de tipus 1, 2 i 3, respectivament.

MATERIALS I MÈTODES

Es va extreure ADN de sang perifèrica dels 20 individus afectes de MH mitjançant la tècnica de Salting-out (veure mètodes dels articles 1 i 2). A partir de l'ADN es van amplificar mitjançant PCR 5 dels 26 exons del gen *SCN1A*. Concretament, es van analitzar els exons 6, 17, 23, 24 i 26, ja que són els únics exons on s'han descrit mutacions associades a MH. Per a amplificar aquests exons, es van utilitzar els següents encebadors i condicions experimentals:

EXÓ	SEQÜÈNCIA DE L'ENCEBADOR (5'À3')	LLARGADA DEL PRODUCTE AMPLIFICAT (PB)	TEMPERATURA D'UNIÓ (°C)
6	Fw -ACTAGCGTTGCAAACATTCTTGG Rv - CCCCTCAAGTATTTATCCTTTG	469	56
17	Fw -ATAATCCTTTCTTGGCAGGCAAC Rv - CAGCTAAACAAGCTGCACTCC	250	65
23	Fw -GCACCAGTGACATTCCAGC Rv -TGGCAGAGAAAACACTCCAAG	271	56
24	Fw -TTGGGGGTGTTTGTCTTC Rv -TTTTCTACTGGAAATGTTAGCTA	440	56
26	Fw -AGGACTCTGAACCTTACCTTG Rv - ATGTACATGTTCAACACAACCA	590	56

Taula 16. Seqüència nucleotídica dels encebadors usats per a amplificar el gen *SCN1A*, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors. Fw indica forward (encebador directe) i Rv reverse (encebador invers).

Els productes de PCR es van purificar i es van preparar mitjançant el kit "ABI BigDye Terminator cycle v3.1" per a procedir a la seva seqüenciació. Les seqüències obtingudes es van analitzar mitjançant el seqüenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) i es van comparar amb la seqüència de referència del gen *SCN1A* (número d'accés a GenBank NM_001202435).

En els casos on el cribratge mutacional resultava positiu, es tornava a amplificar i seqüenciar l'exó on hi havia la mutació.

RESULTATS

Dels 20 casos, només vam trobar una mutació en el pacient 475. La mutació trobada és un canvi en heterozigosi d'una timina per una citosina a la posició 4981 del cADN (c.4981T>C), dins l'exó 26 del gen *SCN1A*. Aquest canvi nucleotídic provoca un canvi d'aminoàcid en la seqüència proteica d'una fenilalanina per una leucina (p.Phe1661Leu).

A la següent figura s'hi representa l'electroferograma de la regió on es va trobar la mutació. S'hi representa la seqüència del pacient 475 i la seqüència d'un individu control.

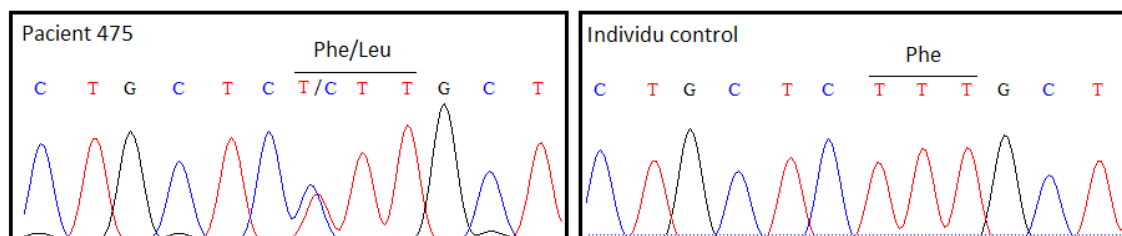


Figura 16. Electroferogrames de la regió que inclou la mutació c.4981T>C. La figura de l'esquerra correspon a la seqüència del pacient 475 i la figura de la dreta correspon a la seqüència d'un individu control.

L'individu afecte forma part d'un pedigrí on hi trobem 15 individus afectes de MH pertanyents a 4 generacions diferents. Malauradament, no vam poder obtenir ADN dels familiars per a poder determinar si la mutació c.4981T>C del gen *SCN1A* és la causant de la MH en aquesta família.

2. SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA EN FORMES MONOGÈNIQUES DE MIGRANYA

En aquest apartat es presenta un estudi de seqüenciació de l'exoma en un subtipus de migranya monogènica: la migranya hemiplègica.

ANNEX 5

SEQÜENCIACIÓ DE L'EXOMA EN MIGRANYA HEMIPLÈGICA

RESUM

La migranya hemiplègica (MH) és un subtipus rar de migranya amb aura que ha estat associat a mutacions en els gens *CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A* aproximadament en un 30% dels casos descrits. El 70% dels casos resten, doncs, sense diagnòstic genètic. Una de les aproximacions genètiques per tal de trobar les variants genètiques causants de la MH en aquests pacients és la seqüenciació de l'exoma.

L'objectiu d'aquest estudi va ser seqüenciar l'exoma en un pacient de MH d'una família multigeneracional d'individus amb MH.

Els resultats negatius d'aquesta anàlisi suggereixen la necessitat de seqüenciar l'exoma en més d'un individu de la mateixa família per tal de poder identificar la variant patogènica causant de la MH.

REFERÈNCIA

M. Vila-Pueyo, E. Cuenca-León, I. García-Martínez, F. Castro, I. Gut, M. Bayés, B. Cormand, A. Macaya (2011) Exome re-sequencing in familial hemiplegic migraine with linkage to 14q32. Presentació en format pòster al "12th International Congress of Human Genetics" realitzat a Montréal.

OBJECTIU DE L'ESTUDI

Dins la cohort de pacients de migranya hemiplègica que el grup ha anat recollint des dels seus inicis, hi ha una família multigeneracional que inclou individus amb migranya hemiplègica (MH), migranya amb aura (MA), migranya sense aura (MO) i individus sans. Aquesta família ha resultat negativa en els cribratges mutacionals dels gens *CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A*.

En un treball previ del grup es va realitzar un estudi de lligament a nivell genòmic per tal de trobar el gen associat a MH en aquesta família (Cuenca-Leon et al., 2009). L'estudi va permetre la identificació d'una regió de 4.15Mb dins la regió cromosòmica 14q32 que cosegregava amb la malaltia. Aquesta regió inclou 47 gens, dels quals se'n van seqüenciar 3 (*ATXN3*, *SLC24A4* i *ITPK1*) ja que, degut a la seva funció, es van escollir com a possibles candidats a ser els causants de la malaltia. El resultat d'aquest cribratge va resultar negatiu.

Per tal de seqüenciar tots els gens inclosos en la regió de lligament, vam decidir utilitzar la seqüenciació de l'exoma sencer en l'individu proband de la família. La seqüenciació de l'exoma és una tècnica que permet la seqüenciació de tots els exons i les regions adjacents, les regions promotores i les regions 5' i 3' UTR. La relació cost/temps d'anàlisi/resultats de l'exoma en comparació amb d'altres tècniques, com per exemple la seqüenciació Sanger, va fer que decidísim seqüenciar l'exoma sencer enlloc de seqüenciar mitjançant Sanger els 47 gens inclosos a la regió.

MATERIALS I MÈTODES

Pacients

Es va extreure ADN genòmic de sang perifèrica de 19 individus d'aquesta família, concretament 6 afectes de MH, 4 de MA, 2 de MO i 6 de sans, mitjançant la tècnica de Salting-out.

Captura de l'exoma i seqüenciació

Es va escollir un dels individus amb MH (individu 2.312) per a seqüenciar-ne l'exoma. La seqüenciació es va realitzar al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica de Barcelona (CNAG) utilitzant el xip d'enriquiment i captura Nimblegen SeqCap EZ Exome Library SZ, el qual inclou 26.7Mb. El seqüenciadore usat va ser el Illumina Genome Analyzer IIx. Es va obtenir una cobertura de 15X en un 82% de les regions.

RESULTATS

Anàlisi de les variants dins la regió de lligament

Suposant un model d'herència dominant (igual que totes les mutacions trobades en MH), es van identificar 62 variants dins la regió de lligament, les quals es troben representades a la taula 17. D'aquestes, cap d'elles era predita com a perjudicial i només una d'elles no era present en la base de dades de variants dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) ni dins del Projecte 1000 Genomes (1000G). Aquesta variant va ser descartada ja que es localitzava a la regió 3'UTR del gen *C14orf49* (del qual se'n desconeix la funció) i el seu efecte era predit com a neutre.

De les 61 variants restants se'n va determinar la freqüència al·lèlica de l'al·lel minoritari (MAF) mitjançant les dades del dbSNP per determinar si alguna d'elles era una variant rara (MAF<0,01). La variant rs17091919, localitzada al gen *CLMN*, tenia una MAF=0,001 i només havia estat descrita en una ocasió. Tot i això, era una variant intrònica i la predicció del seu efecte mitjançant els softwares FuncPred (<http://snppinfo.niehs.nih.gov/snppfunc.htm>) i HSF v2.4.1 (<http://www.umd.be/HSF/>) va donar un efecte nul sobre el mecanisme de *splicing*. De les 60 variants restants, totes amb una MAF>0,05, totes havien estat descrites en més de 79 ocasions, excepte la variant rs12896583, localitzada dins el gen *ATXN3*, que només havia estat descrita en 2 ocasions, però aquesta variant és intrònica i neutra. De les variants restants, tot i ser variants comunes, en vam determinar el seu efecte amb els softwares citats i cap va resultar perjudicial.

VARIANT	CONSEQÜÈNCIA	DBSNP	MAF	GEN	Nº VEGADES DESCRITA
14_95884051_C/T	3'UTR	N/A	-	<i>C14orf49</i>	0
14_92280037_T/C	intrònica	rs10134181	C=0.4364	<i>TC2N</i>	549
14_91942342_T/A	intrònica	rs10145724	T=0.0827	<i>SMEK1</i>	104
14_93182466_G/A	intrònica	rs1242119	A=0.2138	<i>LGMN</i>	269
14_95884323_G/A	no sinònima	rs12434757	G=0.4404	<i>C14orf49</i>	554
14_92537379_T/C	sinònima	rs12896583	C=0.154	<i>ATXN3</i>	2
14_94844843_T/G	no sinònima	rs1303	G=0.2067	<i>SERPINA1</i>	260
14_92549586_G/A	sinònima	rs16999141	G=0.4277	<i>ATXN3</i>	538
14_95675669_G/T	intrònica	rs17091919	T=0.0011	<i>CLMN</i>	1
14_93994870_A/G	intrònica	rs17094893	G=0.4475	<i>KIAA1409</i>	563
14_91948043_T/C	sinònima	rs17127374	T=0.0827	<i>SMEK1</i>	104
14_92189366_T/A	intrònica	rs17127513	A=0.2083	<i>CATSPERB</i>	262
14_92185731_G/A	intrònica	rs17783516	A=0.349	<i>CATSPERB</i>	439
14_94750292_G/A	intergènica	rs1950641	A=0.3696	<i>PPP4R4</i>	465
14_94733474_A/T	intrònica	rs1950644	T=0.3641	<i>PPP4R4</i>	458
14_94007075_C/T	sinònima	rs1951716	T=0.4746	<i>KIAA1409</i>	597
14_93412609_A/G	intrònica	rs1998054	A=0.4785	<i>ITPK1</i>	602
14_95923670_A/C	sinònima	rs2024863	A=0.411	<i>C14orf49</i>	512
14_94097287_G/A	intrònica	rs2148563	G=0.3418	<i>KIAA1409</i>	430
14_92958306_G/A	intrònica	rs2182837	A=0.1844	<i>SLC24A4</i>	232
14_94776221_A/C	no sinònima	rs2228541	A=0.4327	<i>SERPINA6</i>	521
14_94756450_T/A	no sinònima	rs2232700	A=0.3164	<i>SERPINA10</i>	398
14_93199080_C/T	no sinònima	rs2236264	T=0.1868	<i>LGMN</i>	235
14_94581285_G/A	intrònica	rs2239645	A=0.1693	<i>IFI27</i>	213
14_93170741_T/C	intrònica	rs2250672	T=0.4396	<i>LGMN</i>	553
14_91928286_C/	intrònica	rs2273647	T=0.182	<i>SMEK1</i>	229
14_92477168_A/G	intrònica	rs2277526	A=0.3506	<i>TRIP11</i>	441
14_93673655_G/A	intergènica	rs2286653	A=0.098	<i>C14orf142</i>	123
14_93428802_T/A	intrònica	rs2295393	A=0.0787	<i>ITPK1</i>	99
14_93412743_G/A	sinònima	rs2295394	A=0.0914	<i>ITPK1</i>	115
14_94152768_C/G	intrònica	rs2296686	G=0.3227	<i>KIAA1409</i>	406
14_92958398_A/G	intrònica	rs2402168	G=0.1987	<i>SLC24A4</i>	250
14_93170901_A/C	intrònica	rs2402189	A=0.2822	<i>LGMN</i>	355
14_94582926_C/G	3'UTR	rs2799	G=0.1828	<i>IFI27</i>	230
14_93994954_G/A	sinònima	rs28420706	A=0.469	<i>KIAA1409</i>	590
14_92136126_C/G	intrònica	rs3742652	G=0.082	<i>CATSPERB</i>	103

14_93118668_C/T	no sinònima	rs3742717	T=0.2504	RIN3	315
14_93118038_A/G	no sinònima	rs3829947	G=0.450	RIN3	566
14_94419888_A/G	intrònica	rs4243701	A=0.066	ASB2	83
14_92102932_A/G	intrònica	rs4900084	G=0.119	CATSPERB	150
14_94088587_G/A	no sinònima	rs4905081	A=0.3625	KIAA1409	456
14_94103602_G/A	sinònima	rs4905082	G=0.4873	KIAA1409	613
14_94245649_A/G	sinònima	rs4905087	A=0.4006	PRIMA1	504
14_95918625_T/C	sinònima	rs4905318	C=0.4547	C14orf49	572
14_95918741_G/A	intrònica	rs4905319	A=0.4889	C14orf49	615
14_95918745_C/T	intrònica	rs4905320	T=0.4515	C14orf49	568
14_95918759_C/T	intrònica	rs4905321	T=0.4603	C14orf49	579
14_95080803_G/A	no sinònima	rs4934	A=0.4404	SERPINA3	554
14_93542681_A/G	intrònica	rs57173352	G=0.1789	ITPK1	225
14_93814493_A/G	3'UTR	rs58621064	G=0.1626	COX8C	147
14_94004314_T/C	intrònica	rs60388385	C=0.0874	KIAA1409	79
14_94732228_C/T	intrònica	rs61680676	T=0.0922	PPP4R4	116
14_94722748_T/C	intrònica	rs6575402	C=0.3585	PPP4R4	451
14_94847415_A/G	no sinònima	rs6647	G=0.2488	SERPINA1	313
14_93081653_C/T	intrònica	rs75641131	T=0.079	RIN3	100
14_94203917_C/T	intrònica	rs8005268	C=0.4579	PRIMA1	576
14_95088626_G/C	intrònica	rs9323910	C=0.244	SERPINA3	307
14_94756750_T/C	no sinònima	rs941591	C=0.3784	SERPINA10	471
14_94160611_G/A	intrònica	rs960888	G=0.4666	KIAA1409	587
14_93398031_G/C	no sinònima	rs9658655	C=0.1526	CHGA	192
14_95906321_G/A	no sinònima	rs9671369	A=0.4022	C14orf49	506
14_93170993_C/T	sinònima	rs9791	T=0.282	LGMN	355

Taula 17. Característiques de les 62 variants de l'exoma de l'individu afecte de MH situades dins la regió de lligament. A la columna "Variant" s'hi indica el cromosoma, la posició cromosòmica i el canvi de nucleòtid de cada variant

Anàlisi de les variants de tot l'exoma

La manca d'un canvi que pogués explicar la MH dins la regió de lligament, ens va portar a realitzar l'anàlisi de les variants localitzades a tot l'exoma. En tot l'exoma hi havia 22131 variants. Després de filtrar mitjançant les dades del dbSNP, dels 1000G i del CNAG, van quedar 555 variants. D'aquestes, 305 eren neutres, 94 es localitzaven en regions reguladores i 156 tenien un efecte perjudicial; entenent com a perjudicial variants no sinònimes, modificadores

de llocs de *splicing* o modificadores de codons STOP. Les 156 variants predites com a perjudicials, van ser analitzades mitjançant el software Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) el qual en va classificar 36 com a probablement perjudicials. D'aquestes, vam realitzar una recerca bibliogràfica per determinar si alguna es localitzava dins un gen que pogués ser candidat sense obtenir-ne un resultat positiu.

Avaluació de les variants candidates

Degut a l'elevat nombre de variants restants, vam decidir utilitzar les dades obtingudes en l'anàlisi de lligament a nivell genòmic realitzat prèviament per determinar si alguna de les 36 variants cosegregava amb la malaltia dins de la família (Cuenca-Leon et al., 2009). Per fer-ho, vam utilitzar el programa EasyLinkage Plus v5.05. Per a cada gen es van seleccionar 5 SNPs distals i 5 SNPs proximals i es va realitzar una anàlisi multipuntual seguint un model paramètric amb herència dominant, penetrància del 95% o del 99%, taxa de fenocòpies del 1% i prevalença de la malaltia del 0,1 o 0,5 %. Vam fer una primera anàlisi considerant com a afectes els individus MH, després una segona anàlisi considerant com afectes els MH i MA, després els MH, MA i MO i finalment una darrera anàlisi considerant els MH afectes i els MA i MO com a fenotip desconegut. De les 36 variants, 3 tenien un LOD score > 1. Aquestes, localitzades en els gens *LRIT2*, *DPYSL4* i *SYNE2*, van ser seqüenciades mitjançant seqüenciació Sanger en els 19 individus de la família per determinar si cosegregaven amb MH. Les característiques dels encebadors i de les condicions experimentals es troben resumides a la taula 18.

GEN	VARIANT	SEQÜÈNCIA DE L'ENCEBADOR (5'À3')	LLARGADA DEL PRODUCTE AMPLIFICAT (PB)	TEMPERATURA D'UNIÓ (°C)
DPYSL4	c.615C>G	Fw -GGGAACATGAAACAGAATCTCC Rv - TCTCCAACCTTCCAACCT	386	55
LRIT2	c.823G>A	Fw -TCCTGGTGAATTCCTACCTGAT Rv -AATTCAGGGCTATCCCAATCTT	360	55
SYNE2	c.20415C>G	Fw -AGCAAATGACTGTGATGGATTG Rv -AAACACCAACTGGAGGAACACT	390	55

Taula 18. Seqüència nucleotídica dels encebadors, llargada del producte amplificat en parells de bases (pb) i temperatura d'unió de cada parella d'encebadors de l'anàlisi de les variants candidates de l'exoma. *Fw* indica *forward* (encebador directe) i *Rv* *reverse* (encebador invers)

A les següents figures [16, 17 i 18] es representa el pedigrí de la família amb els resultats obtinguts de les 3 variants seleccionades. Com s'hi pot veure, cap de les 3 presenta una cosegregació correcta amb la patologia.

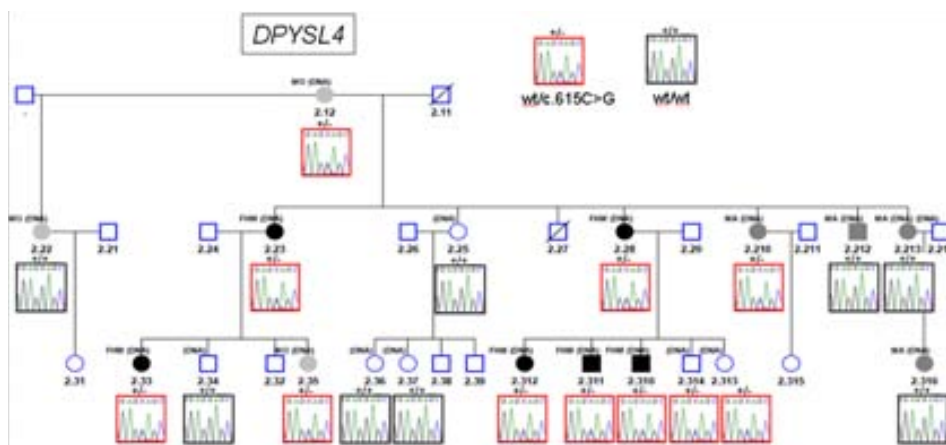


Figura 16. Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.615C>G del gen DPYSL4. Els individus en negre són els afectes de MH, els grisos fosc els de MA, els grisos clar els de MO i els blancs els sans. Els electroferogrames enquadrats en vermell indiquen la presència de la variant c.615C>G i els enquadrats en negre indiquen la variant normal. FHM indica migranya hemiplègica familiar.

Figura 17. Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.823G>A del gen LRIT2. Els individus en negre són els afectes de MH, els grisos fosc els de MA, els grisos clar els de MO i els blancs els sans. Els electroferogrames enquadrats en vermell indiquen la presència de la variant c.823G>A i els enquadrats en negre indiquen la variant normal. FHM indica migranya hemiplègica familiar; ? indica que no es va poder determinar la seqüència d'aquest individu.

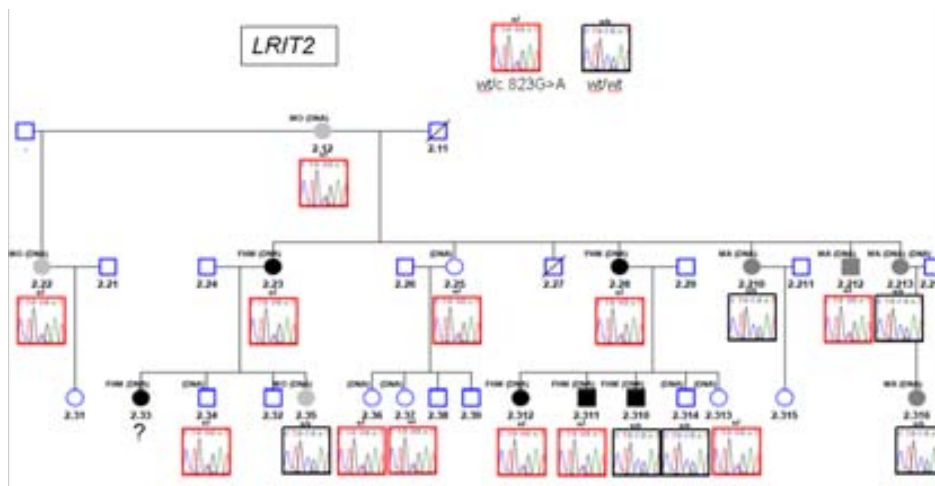
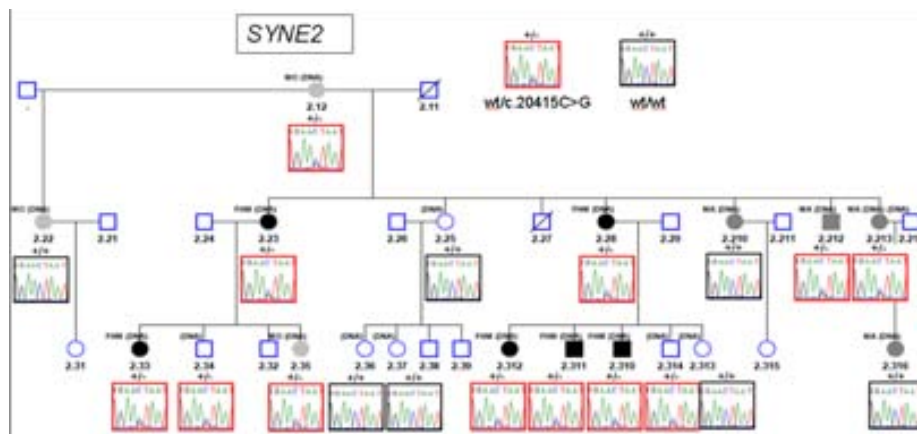


Figura 18. Pedigrí de la família amb els resultats de la seqüenciació de la variant c.20415C>G del gen SYNE2. Els individus en negre són els afectes de MH, els grisos fosc els de MA, els grisos clar els de MO i els blancs els sans. Els electroferogrames enquadrats en vermell indiquen la presència de la variant c.20415C>G i els enquadrats en negre indiquen la variant normal. FHM indica migranya hemiplègica familiar.



3. ESTUDIS GENÈTICS EN MIGRANYA

En aquest apartat es presenta un estudi d'associació genètica en la forma més comuna de migranya: la migranya sense aura. Aquest estudi ha estat realitzat com a grup col·laborador dins el *International Headache Genetics Consortium*.

ANNEX 6

UN ESTUDI D'ASSOCIACIÓ A NIVELL GENÒMIC IDENTIFICA UN LOCI DE SUSCEPTIBILITAT A LA MIGRANYA SENSE AURA

RESUM

La migranya sense aura (MO) és la forma més comuna de migranya, caracteritzada per la presència d'episodis freqüents de cefalea incapacitant i de símptomes autonòmics associats.

Per tal d'identificar variants genètiques comunes associades amb aquest tipus de migranya, es va realitzar un GWAS on es van analitzar pacients amb migranya sense aura (MO). L'estratègia que es va seguir en aquest estudi es va basar en una primera fase de descobriment que incloïa una mostra clínica de 2 cohorts de pacients: una d'elles d'Alemanya i l'altra d'Holanda. Aquesta primera fase es va realitzar en un total de 2326 pacients i 4580 controls. Els SNPs que presentaven valors estadístics més significatius van ser replicats en una segona fase de replicació. En aquesta fase es va utilitzar una mostra clínica de 4 cohorts de pacients: una d'Espanya, una d'Holanda, una de Finlàndia i una de Noruega. En total, es van replicar els resultats en 2508 migranyosos sense aura i 2652 controls.

Dels resultats obtinguts mitjançant la fase de descobriment i la posterior fase de rèplica, es van trobar associats a migranya un SNP localitzat en el gen *MEF2D* i un SNP proper al gen *TGFBR2*. També es van trobar SNPs que suggerien una tendència a la replicació en el gens *PHACTR1* i *ASTN2*. A més a més, es van replicar els resultats obtinguts en un GWAS anterior, trobant novament associats a migranya els gens *TRPM8* i *LRP1*.

Aquest estudi identifica el primer *loci* d'associació a susceptibilitat a patir MO, permetent un avenç en el coneixement en aquest trastorn neurològic tant debilitant.

La participació del nostre grup de recerca en aquest estudi es va basar fonamentalment en la inclusió d'una cohort de 837 individus amb MO i 1000 individus sense migranya en la fase de replicació dels resultats obtinguts en la fase de descobriment.

REFERÈNCIA

Freilinger T et al. (2012) Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 44:777-782.

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

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

Migraine without aura is the most common form of migraine, characterized by recurrent disabling headache and associated autonomic symptoms. To identify common genetic variants associated with this migraine type, we analyzed genome-wide association data of 2,326 clinic-based German and Dutch individuals with migraine without aura and 4,580 population-matched controls. We selected SNPs from 12 loci with 2 or more SNPs associated with P values of $<1 \times 10^{-5}$ for replication testing in 2,508 individuals with migraine without aura and 2,652 controls. SNPs at two of these loci showed convincing replication: at 1q22 (in *MEF2D*; replication $P = 4.9 \times 10^{-4}$; combined $P = 7.06 \times 10^{-11}$) and at 3p24 (near *TGFB2*; replication $P = 1.0 \times 10^{-4}$; combined $P = 1.17 \times 10^{-9}$). In addition, SNPs at the *PHACTR1* and *ASTN2* loci showed suggestive evidence of replication ($P = 0.01$; combined $P = 3.20 \times 10^{-8}$ and $P = 0.02$; combined $P = 3.86 \times 10^{-8}$, respectively). We also replicated associations at two previously reported migraine loci in or near *TRPM8* and *LRP1*. This study identifies the first susceptibility loci for migraine without aura, thereby expanding our knowledge of this debilitating neurological disorder.

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

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

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

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

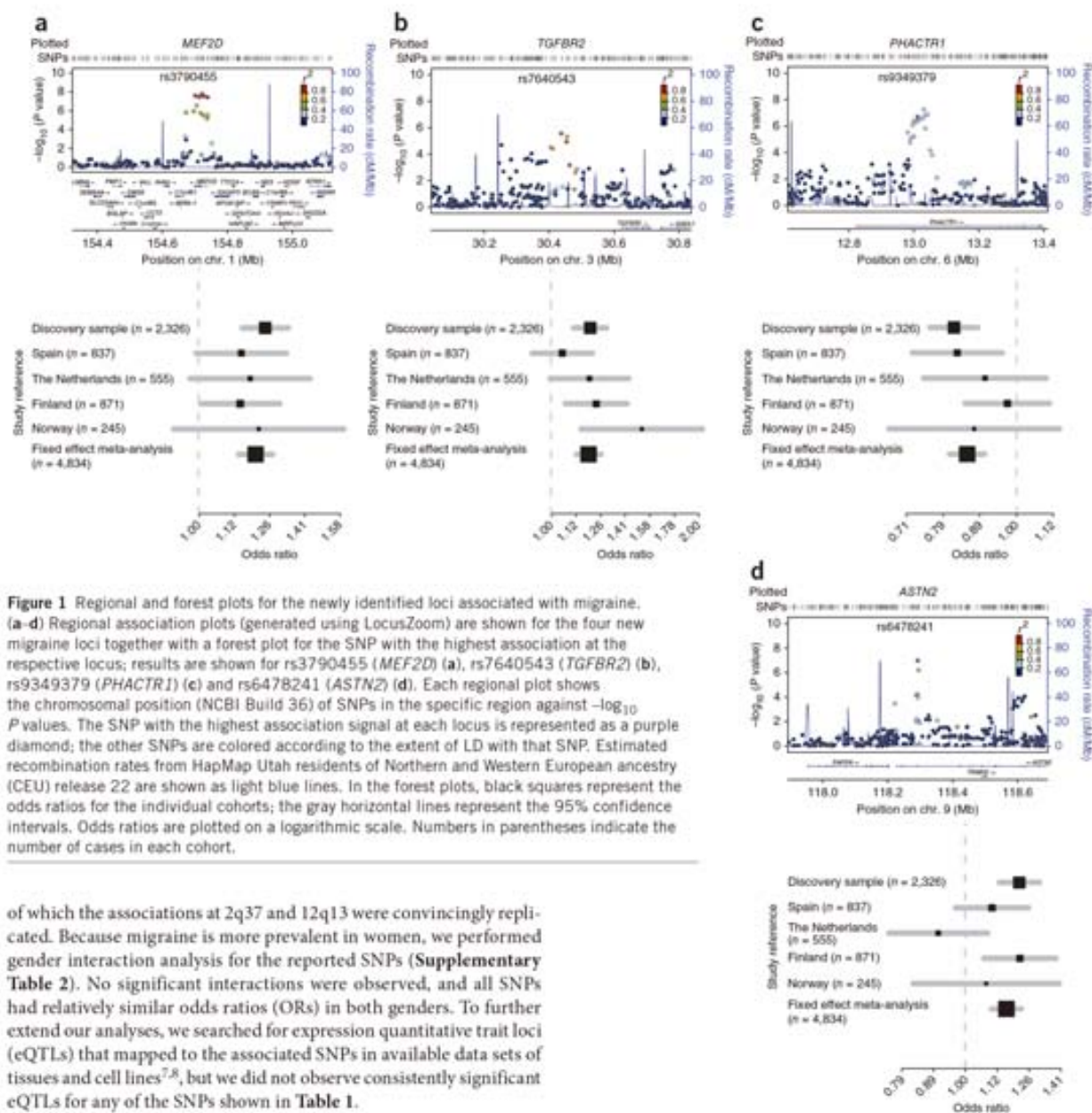


Figure 1 Regional and forest plots for the newly identified loci associated with migraine. (a–d) Regional association plots (generated using LocusZoom) are shown for the four new migraine loci together with a forest plot for the SNP with the highest association at the respective locus; results are shown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

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

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

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

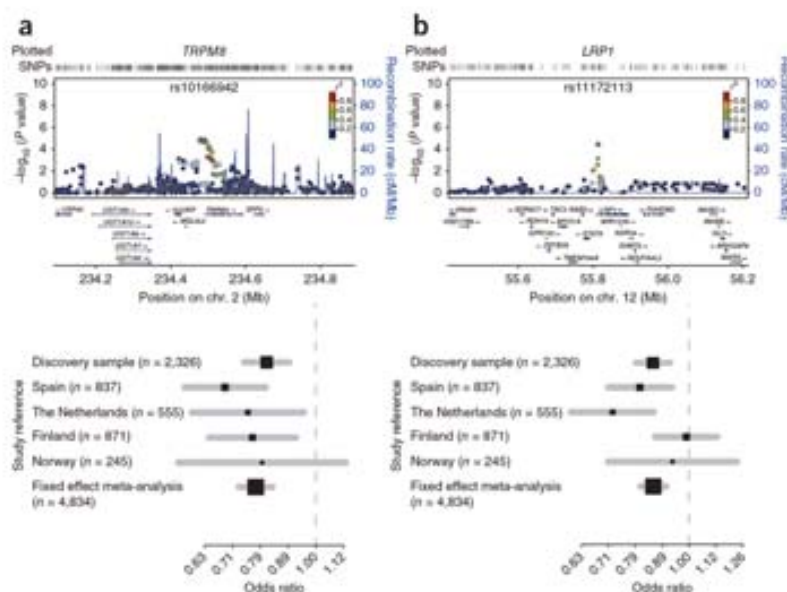
Table 1 SNPs at the six loci associated with migraine without aura

SNP	General SNP information					Discovery samples			All replications			Overall meta-analysis					
	Chr.	Position ^a	Location	Gene ^b	Minor allele frequency	Sequence type ^c	P value	OR (95% CI)	r ²	P value	OR (95% CI)	r ²	P value	OR (95% CI)	r ² with top SNP		
Locus 1																	
rs1050316	1	154701327	Intragenic	<i>MEF2D</i>	G	0.34	Imputed	2.59 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	1.15 × 10 ⁻³	1.14 (1.06–1.24)	0.00	3.21 × 10⁻¹⁰	1.19 (1.13–1.26)	0.00	0.987
rs2274316	1	154712866	Intragenic	<i>MEF2D</i>	C	0.35	Genotyped	3.60 × 10⁻⁸	1.23 (1.14–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.986
rs1925950	1	154717364	Intragenic	<i>MEF2D</i>	G	0.35	Imputed	2.97 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.988
rs3790455	1	154722925	Intragenic	<i>MEF2D</i>	C	0.34	Genotyped	1.71 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.34)	0.00	4.85 × 10 ⁻⁴	1.16 (1.07–1.26)	0.00	7.06 × 10⁻¹¹	1.20 (1.14–1.27)	0.00	–
rs3790459	1	154728331	Intragenic	<i>MEF2D</i>	A	0.35	Imputed	2.85 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.989
rs12136856	1	154739738	Intragenic	<i>MEF2D</i>	C	0.34	Imputed	3.90 × 10⁻⁸	1.23 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.985
Locus 2																	
rs7640543	3	30437407	Intergenic	<i>TGFBR2</i>	A	0.32	Genotyped	2.72 × 10 ⁻⁶	1.20 (1.11–1.30)	0.00	1.02 × 10 ⁻⁴	1.18 (1.09–1.29)	0.51	1.17 × 10⁻⁸	1.19 (1.13–1.26)	0.19	–
Locus 3																	
rs9349379	6	13011943	Intragenic	<i>PHACTR1</i>	G	0.38	Genotyped	2.06 × 10 ⁻⁷	0.82 (0.77–0.89)	0.00	0.01	0.90 (0.83–0.98)	0.00	3.20 × 10⁻⁸	0.86 (0.81–0.91)	0.10	–
Locus 4																	
rs6478241	9	118292450	Intragenic	<i>ASTN2</i>	A	0.38	Genotyped	1.14 × 10 ⁻⁷	1.22 (1.13–1.31)	0.00	0.02	1.10 (1.02–1.19)	0.57	3.86 × 10⁻⁸	1.16 (1.10–1.23)	0.56	–
Locus 5																	
rs10166942	2	234489832	Intergenic	<i>TRPM8</i>	C	0.18	Genotyped	1.32 × 10 ⁻⁵	0.82 (0.74–0.89)	0.00	5.62 × 10 ⁻⁹	0.74 (0.67–0.82)	0.00	9.83 × 10⁻¹³	0.78 (0.73–0.84)	0.00	–
rs17862920	2	234492734	Intragenic	<i>TRPM8</i>	T	0.10	Genotyped	2.19 × 10 ⁻⁵	0.78 (0.69–0.87)	0.00	6.44 × 10 ⁻⁵	0.75 (0.66–0.87)	0.00	5.97 × 10⁻⁹	0.77 (0.70–0.84)	0.00	0.520
Locus 6																	
rs11172113	12	55613550	Intragenic	<i>LRP1</i>	C	0.40	Genotyped	3.38 × 10 ⁻⁵	0.86 (0.80–0.92)	0.00	2.33 × 10 ⁻⁴	0.86 (0.79–0.93)	0.67	2.97 × 10⁻⁸	0.86 (0.81–0.91)	0.45	–

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

METHODS

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

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

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

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

11. Aurora, S.K. & Wilkinson, F. The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia* **27**, 1442–1453 (2007).
12. Ferrari, M.D., Diener, H.C., Bos, K.D., Malesky, M.J. & Bruyn, G.W. Neuroexcitatory plasma amino acids are elevated in migraine. *Neurology* **40**, 1582–1586 (1990).
13. Martínez, F., Castillo, J., Rodríguez, J.R., Leira, R. & Noya, M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia* **13**, 89–93 (1993).
14. Tottene, A. et al. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in $Ca_v2.1$ knockin migraine mice. *Neuron* **61**, 762–773 (2009).
15. Flavell, S.W. et al. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* **60**, 1022–1038 (2008).
16. Morrow, E.M. et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* **321**, 218–223 (2008).
17. Pfeiffer, B.E. et al. Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron* **66**, 191–197 (2010).
18. Schytz, H.W. et al. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* **132**, 16–25 (2009).
19. Markovics, A. et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* **45**, 633–644 (2012).
20. Goadsby, P.J., Lipton, R.B. & Ferrari, M.D. Migraine—current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* **346**, 257–270 (2002).
21. Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A. & Lodish, H.F. Expression cloning of the TGF- β type 2 receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775–785 (1992).
22. Law, C. et al. Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor β receptor 2 gene. *J. Med. Genet.* **43**, 908–916 (2006).
23. Rist, P.M., Diener, H.C., Kurth, T. & Schürks, M. Migraine, migraine aura, and cervical artery dissection: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia* **31**, 886–896 (2011).
24. Allen, P.B., Greenfield, A.T., Svenningsson, P., Haspelagh, D.C. & Greengard, P. Phactr1–4: a family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7187–7192 (2004).
25. Greengard, P., Allen, P.B. & Nairn, A.C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* **23**, 435–447 (1999).
26. Jarray, R. et al. Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. *Biochimie* **93**, 1668–1675 (2011).
27. Myocardial Infarction Genetics Consortium. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat. Genet.* **41**, 334–341 (2009).
28. Tietjen, G.E. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia* **29**, 987–996 (2009).
29. Wilson, P.M., Fryer, R.H., Fang, Y. & Hatten, M.E. *Astr2*, a novel member of the astrofelin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *J. Neurosci.* **30**, 8529–8540 (2010).
30. DaSilva, A.F., Granziera, C., Snyder, J. & Hadjikhani, N. Thickening in the somatosensory cortex of patients with migraine. *Neurology* **69**, 1990–1995 (2007).
31. Kruit, M.C. et al. Migraine as a risk factor for subclinical brain lesions. *J. Am. Med. Assoc.* **291**, 427–434 (2004).
32. Proudfoot, C.J. et al. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* **16**, 1591–1605 (2006).
33. Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D. & Heppenstall, P.A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS ONE* **4**, e7383 (2009).
34. d'Agostino, V.C., Francia, E., Licursi, V. & Cerbo, R. Clinical and personality features of allodynic migraine. *Neurol. Sci.* **31** (suppl. 1), S159–S161 (2010).
35. Lillis, A.P., van Duyn, L.B., Murphy-Ulrich, J.E. & Strickland, D.K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* **88**, 887–918 (2008).
36. May, P. et al. Neuronal LRP1 functionality associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8872–8883 (2004).
37. Russell, M.B., Rasmussen, B.K., Fenger, K. & Olesen, J. Migraine without aura and migraine with aura are distinct clinical entities: a study of four hundred and eighty-four male and female migraineurs from the general population. *Cephalalgia* **16**, 239–245 (1996).
38. Kalliele, M., Wessman, M., Havanka, H., Palotie, A. & Färkkilä, M. Familial migraine with and without aura: clinical characteristics and co-occurrence. *Eur. J. Neurol.* **8**, 441–449 (2001).

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

ONLINE METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



4. ESTUDIS EPIGÈNÈTICS EN MIGRANYA

En aquest apartat es presenta l'estudi epigenètic en un model animal d'un de les formes més comunes de migranya: la migranya amb aura.

ANNEX 7

CANVIS EPIGÈNÈTICS EN UN MODEL DE MIGRANYA AMB AURA EN RATA

RESUM

La migranya amb aura (MA) és un subtipus de migranya caracteritzat per la presència de perturbacions neurològiques reversibles que precedeixen la cefalea. Es postula que els mecanismes epigenètics medien la susceptibilitat a patir migranya. La depressió cortical propagant (DCP), el fenomen fisiològic subjacent de l'aura migranyosa, és una ona de despolarització i depressió neuronal que es suprimeix amb l'administració crònica d'alguns tractaments preventius de migranya, com per exemple l'àcid valproic (VPA) i el topiramà (TPM). Mitjançant un model de DCP en rata, vam investigar si el VPA i el TPM disminueixen la susceptibilitat a desenvolupar DCPs induint canvis en la metilació de l'ADN cerebral.

Es van tractar rates mascles adultes Sprague-Dawley amb VPA, TPM o sèrum durant 4 setmanes. Es van induir DCPs mitjançant KCl durant 1 hora. Es va extreure ADN dels còrtex cerebrals per tal de realitzar un estudi de metilació de l'ADN a nivell genòmic. Els resultats van ser analitzats mitjançant el software MEDIPS per tal d'obtenir regions diferencialment metilades (RDM). Els gens que contenien RDMs van ser analitzats mitjançant els softwares GO i KEGG per tal d'analitzar l'enriquiment de vies funcionals i mitjançant el software IPA per construir les xarxes gèniques.

Ambdós tractaments van reduir la intensitat de les DCPs i van induir diferències de metilació (DM) en gens pertanyents a les vies de "activitat sinàptica". El tractament amb VPA es va associar amb DM en gens codificants de canals iònics

i gens involucrats en el transport de glutamat. El tractament amb TPM va promoure DM en gens involucrats en el desenvolupament i la diferenciació neuronal i en el gen *Rhobtb3*, el qual codifica per una proteïna que interacciona amb el receptor de serotonina 5-HT7. La DCP va modificar la metilació de gens involucrats en el creixement axonal, la modulació del dolor i la proliferació neuronal.

Aquests resultats podrien indicar que el VPA i el TPM protegeixen davant les DCPs degut al seu efecte sobre la metilació de l'ADN, emfatitzant la importància dels mecanismes epigenètics en la susceptibilitat de la migranya. Es necessiten més anàlisis per tal de determinar el potencial dels gens identificats en la determinació de la migranya en humans.

REFERÈNCIA

Vila-Pueyo M, Fernández-Castillo N, Queirós A, Kulis M, Martín-Subero JI, Pozo-Rosich P, Cormand B, Macaya A. Epigenetic changes in a rat model of migraine with aura. Article sotmès a la revista *Annals of Neurology*.

Epigenetic changes in a rat model of migraine with aura

Marta Vila-Pueyo, Noèlia Fernández-Castillo, Ana Queiros, Marta Kulis, Iñaki Martín-Subero, BruCormand, Patricia Pozo-Rosich, AlfonsMacaya

ABSTRACT

Objective: Migraine with aura (MA) is a subtype of migraine characterized by reversible neurological disturbances preceding headache. Epigenetic mechanisms are postulated to mediate migraine susceptibility. MA neurophysiological correlate is cortical spreading depression (CSD), a wave of neuronal depolarization and depression that is suppressed by chronic administration of the migraine preventive drugs valproate (VPA) and topiramate (TPM). Using a CSD rat model, we investigated if VPA and TPM lower the susceptibility to develop CSD by inducing changes in DNA methylation in the brain.

Materials and methods: Adult male Sprague-Dawley rats were treated with VPA, TPM or saline for 4 weeks. CSDs were KCl-induced for 1 hour. Cerebral cortices were removed and DNA was extracted to perform MBD-based genome-wide methylation sequencing. Results were analyzed by MEDIPS software to obtain differentially methylated regions (DMRs). Genes containing DMRs were analyzed for functional enrichment. DMRs were validated by bisulfite pyrosequencing.

Results: Both treatments reduced CSD intensity and induced differential methylation (DM) of genes belonging to "synapse activity" pathways including *Rimbp2*, *Pcdhb3* and *Grip1* genes. Treatment with VPA was associated with DM of ion channel encoding-genes (*Asic2* and *Kcnd2*) and of genes involved in transport of glutamate (*Slc25a13* and *Slc38a1*). Treatment with TPM, in turn, promoted DM of genes involved in neural development and differentiation (*Wnt7a* and *Ankrd6*), and also in *Rhobtb3* gene, encoding a protein that interacts with the serotonin receptor 5-HT₇. Interestingly, CSD modified the methylation status of genes involved in axon growth and guidance (*Cdh13* and *Ephb2*); modulation of pain (*Mrgprx3*) or neuronal proliferation (*Mapk10*).

Interpretation: These results confirm that VPA and TPM protect against CSD in the rat and induce changes in DNA methylation in the brain, emphasizing the importance of epigenetic mechanisms in migraine susceptibility. Further analyses are required to determine the potential of the identified targets in determining susceptibility to human migraine.

Keywords: cortical spreading depression (CSD), migraine, DNA methylation, valproate, topiramate, epigenetics,

Abbreviations: GWAS, genome-wide association studies; CSD, cortical spreading depression; EEG, electroencephalogram; Panx1, pannexin1; NMDA receptor, N-methyl-D-aspartate; VPA, valproate; TPM, topiramate; MBDS, methyl binding domain sequencing; DM, differentially methylated; DMR, differentially methylated region; CGI, CpG Island; BPS, bisulfite pyrosequencing; HDAC inhibitor, histone deacetylase inhibitor.

INTRODUCTION

Migraine is a neurological disorder characterized by recurrent attacks of unilateral moderate-to-severe headache that is aggravated by physical activity and is associated with nausea and/or photophobia and phonophobia. Approximately one third of migraine sufferers experience transient neurological disturbances that precede the headache: the migraine aura. Cortical spreading depression (CSD), the neurophysiological correlate of migraine aura, is a short-lasting neuronal and glial depolarization wave that moves across the cortex and is followed by a wave of depression of evoked and spontaneous electroencephalogram (EEG) activity.^{1,2} CSD has been largely hypothesized to be the trigger of headache mechanisms³ due to its persistent activation of meningeal nociceptors.^{4,5}

Several studies have suggested that significant genetic mechanisms underlie migraine. Over the last years, genome-wide association studies (GWAS) have provided significant loci linked to migraine.⁶⁻¹⁰ However, they do not explain the whole complexity of this disorder. Migraine susceptibility is also modulated by external and internal non-genetic factors such as sex hormones, lifestyle and environmental changes.¹¹⁻¹³ This might be explained by the effect of epigenetic mechanisms. In fact, there is increasing evidence that epigenetic factors play an important role in a wide variety of diseases, including neurological diseases such as stroke and epilepsy.^{14,15} Moreover, the influence of epigenetic mechanisms in migraine has been highlighted in a recent review where a model for migraine pathophysiology and chronification has been proposed.^{16,17} Also, a study where the methylation status of genes of the calcitonin gene-related peptide (CGRP)-ergic system probably involved in the generation of a migraine attack has been published.¹⁷

A number of studies have proven the suppression of CSD by preventive anti-migraine drugs, including the antiepileptics valproate and topiramate, when administered chronically, but not acutely, in different *in vivo* models of rat and cat.¹⁸⁻²² This need for chronically administration prompted us to hypothesize that mechanisms involved in migraine prevention might be acting at a genomic level, involving epigenetic mechanisms such as modifying the DNA methylation status of genes that might be related to migraine susceptibility. Valproate (VPA) is a potent histone deacetylase inhibitor, a modifier of the chromatin structure and a facilitator of DNA demethylation, causing an overall increase of the transcriptional activity.^{23,24} VPA-induced gene expression changes have been examined, both *in vitro* and *in vivo*.^{23,25-30} VPA effects on DNA methylation have also been demonstrated;^{23,30-32} nevertheless, all previous studies are focused on specific genes or changes in global methylation levels, except for a recent study that analyzed the methylation status of 27K CpG sites in human neuroblastoma cells.³³ Topiramate (TPM) is also a histone deacetylase inhibitor.³⁴ Its effects on gene expression have been less investigated, but at least one *in vivo* and one *in vitro* assays documented significant variations.^{35,36}

With the aim to understand whether epigenetic changes may affect migraine susceptibility, we explored the effects of VPA and TPM on DNA methylation in a CSD-induced animal model of migraine with aura.

MATERIALS AND METHODS

Experimental groups. Thirty-six adult male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories, Spain) received single daily intraperitoneal injections for 4 weeks with saline (Fisiologico Braun 0.9%, B. Braun, Spain), VPA (200mg/kg; Sanofi-aventis, Spain) or TPM (80mg/kg; gift by Janssen-Cilag, Spain); chosen dosages were based on published data.¹⁹ The animals weighed between 215g and 360g at the beginning of the treatment period and between 290g and 470g on the day of recordings. Rats were divided into 4 experimental groups (n=9/group): (1) Sham-operated group: rats were injected with saline, surgery was performed but CSD was not induced; (2) Saline group: rats were injected with saline, surgery was performed and CSD was induced; (3) VPA group: rats were treated with VPA, surgery was performed and CSD was induced; (4) TPM group: rats were treated with TPM, surgery was performed and CSD was induced. The study was approved by the institutional ethics committee and guidelines for animal care were followed.

Anesthesia and surgery. Rats were anesthetized using isoflurane (4.5% induction, 1-1.5% maintenance, in 70% N₂O/30% O₂). Temperature was kept at 37°C using a heating pad. Rats were placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, USA) and 2 burr holes were drilled over the right hemisphere at the following coordinates (mm from bregma): (1) posterior 5, lateral 2: KCl application site; (2) posterior 0.5, lateral 2: recording site. Dura overlying the cortex was gently removed and care was taken to avoid bleeding.

Electrophysiological recordings. Cortical direct current (DC) potential shifts were recorded with glass micropipettes (Harvard apparatus, USA) filled with NaCl 4M, 500µm below the dural surface. Ag/AgCl reference electrode (World Precision Instruments, USA) was placed subcutaneously in the neck. After surgical preparation, the cortex was allowed to recover for 15 minutes under saline irrigation. The data were amplified, digitized and recorded using a data acquisition system (Neurolog system, UK) and were displayed on an online data analysis system (CED Spike2 v7.03 software).

CSD induction. CSDs were induced by placing a cotton ball soaked with KCl 1M over the pial surface at the application site, which was kept moist with 5µl every 15 minutes. The total number of KCl-induced CSDs was counted during 1 hour of KCl application.

Samples. After 1 hour of recordings, animals were euthanized by decapitation and brains were gently removed from the skull. Right cortices (CSD-induced) were dissected and flash frozen in liquid nitrogen.

Total DNA isolation. Frozen right cortices of all 36 rats were mechanically homogenized in liquid nitrogen with a mortar and pestle. DNA was extracted from the tissue powder by using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Spain) according to the manufacturer's specifications. Concentration and integrity of DNA was determined on a Fluostar Optima plate reader (BMG Labtech, Germany) with the Quant-iT™ Picogreen® dsDNA assay kit (Invitrogen, Belgium) on 480/520 nm.

MBD-based genome-wide methylation sequencing. We selected 6 rats from each experimental group to carry out MBD-sequencing. 3 µg of DNA were fragmented on Covaris S2

(Covaris, USA) with following settings: duty cycle 10%, intensity 5, 200 cycles per burst during 190 seconds, to obtain fragments with an average length of 200bp. Then, methylated DNA was captured using the MethylCap kit (Diagenode, Belgium) and 250ng of it were used to perform library preparation on Apollo 324 with PrepX-DNA Library Kit (IntegenX, USA). Library amplification was performed according to multiplexed paired end ChIP protocol. Samples were adjusted to 10nM and sequenced in an Illumina Hi-Seq 2000 (Illumina, USA).

Mapping and peak calling for MBD2 enrichment. FASTQ sequence reads were generated using the IlluminaCasava pipeline version 1.8.0. Paired end 51bp sequence reads were mapped to the rat genome (UCSC assembly rn4, NCBI build RGSC_v3.4) using Bowtie v0.12.9 software. Bowtie files were converted into bam format.

Quality control of MBD-sequencing. Three different approaches provided by MEDIPS software v1.10.0 were used to perform a quality control of MBD-sequencing.³⁷ First, a saturation analysis calculates if the mapped reads are enough to generate a saturated and reproducible coverage profile of the reference genome. Then, it calculates the CpG coverage rate testing the number of CpGs covered by the given reads and the depth of coverage per CpG. Finally, the CpG enrichment is calculated to ensure that the enrichment for methylated DNA was correct by determining the CpG dinucleotide frequency (dividing the sequence reads by the relative frequency of CpG dinucleotides in the reference genome).

Identification and annotation of differentially methylated regions (DMRs). To identify differentially methylated regions (DMRs) we analyzed the bam files obtained from MBD-sequencing with the MEDIPS v1.10.0 software. We considered significant DMRs when FDR \leq 0.05, fold change \geq 2 and regions were methylated at least in 4 out of 6 replicates. Genomic feature data was retrieved from UCSC Genome Browser database (assembly rn4) to annotate genes described, by using RefSeq Genes, Ensembl Genes, RGD Genes, tRNA Genes and miRNA tracks; genes predicted, by using Genscan, Geneid Genes and SGP Genes tracks; CpG islands (CGIs), by using CpG Islands and CpG Islands (AL) tracks; proximal promoters, which were defined as regions within 1kb upstream and 500pb downstream from the transcription start site of described genes; distal promoters, which were defined as regions within 5kb upstream and 500pb downstream from the transcription start site of described genes; and conservation, by using Conservation (multiz9way) track; with MEDIPS software.

Bisulfite pyrosequencing validation. To validate the DNA methylation data, bisulfite pyrosequencing analysis was performed as previously described³⁸. Briefly, genomic DNA was bisulfite converted using EpiTectPlus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's specifications. A subsequent PCR amplification was performed using biotinylated primers (primer sequences are shown in **Table S3**). Pyrosequencing and data analysis were performed with the pyrosequencer analyzer PyroMark Q96 (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions.

Pathway analysis. All genes described containing DMRs within their intronic or exonic regions were analyzed for Gene Ontology (GO) and KEGG pathways enrichment using the DAVID functional Annotation Tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)³⁹ and the WebGestalt software (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>)⁴⁰, with adjusted p-value \leq 0.05. Networks

containing the genes with DMRs were constructed using the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, USA).

We did not consider for these analyses those genes with DMRs in their promoter regions, because we assumed, as proposed, different methylation patterns in promoter and intragenic regions and there were not enough genes with DMRs in their promoter region as to perform this kind of analysis.⁴³ DMRs annotated within predicted genes were not either considered because they are not included in GO, KEGG or IPA softwares.

Gene function analysis. Extensive bibliographic research was performed in order to unravel possible biological and/or functional links between the genes containing DMRs and migraine or other related neurological symptoms. Following databases were used: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) and Rat Genome Database (<http://rgd.mcw.edu/>). We did not consider for this research those genes that are predicted, because the lack of information about them in the available databases.

Bisulfite pyrosequencing validation. To validate the DNA methylation data, bisulfite pyrosequencing analysis was performed as previously described³⁸. Briefly, genomic DNA was bisulfite converted using EpiTectPlus Bisulfite Conversion Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's specifications. A subsequent PCR amplification was performed using biotinylated primers (primer sequences are shown in **Table S3**). Pyrosequencing and data analysis were performed with the pyrosequencer analyzer PyroMark Q96 (Qiagen, Germany) according to manufacturer's instructions.

RESULTS

VPA and TPM treatments reduced CSD frequency. 36 Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups: sham-operated, saline, VPA and TPM group (information of each group is specified in Materials and methods). Rats were injected with saline, VPA or TPM for 4 weeks. Then, we registered the cortical DC potential shifts during 1 hour of KCl induction (**Fig 1**). Treatment reduced CSD frequency, as previously described.¹⁹ Statistically significant differences were found when comparing the number of CSDs that occurred per hour in the saline (11.6 ± 2.7) and the VPA (6.2 ± 2.1) groups ($p < 0.0004$) and the VPA and the TPM (10.6 ± 3.2) group ($p = 0.004$). In contrast, no significant differences were found between the saline and the TPM groups (**Fig 1**).

Genome-wide distribution of methylated regions do not show differences between groups. MBD-sequencing (MBDS) was used to determine genome-wide DNA methylation profiles in the right cerebral cortices from sham-operated rats; saline, VPA and TPM administered rats. Total reads and mapped reads are summarized in **Table S1**. Taking into account all the regions sequenced and mapped, there were no significant differences in the overall methylation levels between groups (ANOVA test, $p > 0.05$). We analyzed the genomic distribution of all methylated regions and classified them between intergenic, intronic, exonic and promoter regions. The highest number of methylated regions were within intergenic regions, followed by introns, exons and promoters, without significant differences between groups (**Fig 2**). This distribution is consistent with previously published genome-wide methylation studies.⁴¹

Quality control of MBD-sequencing. All samples correctly passed the quality control analysis performed with MEDIPS software. Results of all samples are shown in **Table S2**. We considered that quality control parameters were correct if saturation > 0.5 , 5x CpG coverage rate > 0.05 and CpG enrichment > 1.4 . Threshold cutoff values were based on previously published data.⁴²

Effects of CSD on DNA methylation. In order to detect the effects of CSD on DNA methylation, we compared the results of MBDS of the sham-operated and the saline group. The analysis retrieved 283 DMRs (84 methylated in the sham-operated group and 199 in the saline group); 222 of them were classified as intragenic (82 within described genes and 208 within predicted genes) and 61 as intergenic (6 within CGIs, 1 within proximal promoter and 6 within distal promoters). 165 out of 283 DMRs were found within conserved regions.

DMRs found within described genes and promoters were annotated and classified according to the group where they were found hypermethylated, whether the sham-operated or the saline group (**Table 1**). We looked into different databases to characterize each described gene containing a DMR. Among all, we chose as potential functional candidates, as listed in **Table 2**, by prioritizing those expressed in the central nervous system, previously linked to a neurological disorder or functionally related to any of the postulated migraine mechanisms.

Moreover, we analyzed those genes containing DMRs for functional group over-representation by using GO, KEGG and IPA. Interestingly, we found functions over-represented related to nerve development and pathways related to axonal guidance signaling. Results are shown in **Table 3**.

Effects of VPA on DNA methylation. In order to detect the effects of VPA on DNA methylation, we compared the results of MBDS of the saline and the VPA group. The analysis retrieved 224 DMRs (97 methylated in the VPA and 127 in the saline group); 144 of them were classified as intragenic (72 within described genes and 138 within predicted genes) and 80 as intergenic (8 within CGIs, 1 within proximal promoter and 4 within distal promoters). 152 out of 224 DMRs were found within conserved regions. We annotated DMRs found within described genes and promoters and classified them according to the group, saline or VPA, where they were found hypermethylated. The results are shown in **Table 1**. As in the previous comparison, we looked into different databases to choose potential candidate genes containing a DMR, which are listed in **Table 4**. We analyzed those described genes containing DMRs for functional group over-representation. Interestingly, we found several functions over-represented related to transporter and channel activity. Results are shown in **Table 5**.

Effects of TPM on DNA methylation. In order to detect the effects of TPM on DNA methylation, we compared the results of MBDS of the saline and the TPM group. The analysis retrieved 226 DMRs (58 methylated in the TPM and 168 in the saline group); 175 of them were classified as intragenic (61 within described genes and 170 within predicted genes) and 51 as intergenic (16 within CGIs, 3 within proximal promoter and 6 within distal promoters). 159 out of 226 DMRs were found within conserved regions. We annotated DMRs found within described genes and promoters and classified them according to the group, saline or TPM, where they were found hypermethylated. The results are shown in **Table 1**. We looked into different databases to choose potential candidate genes containing a DMR (**Table 6**). We analyzed those described genes containing DMRs for functional group over-representation. Interestingly, we found functions over-represented related to dendrite and neuron projection and pathways related to glutamate signaling. Results are shown in **Table 7**.

Comparison of VPA and TPM effects on DNA methylation. In order to detect common effects of both treatments on DNA methylation, we compared the results obtained from the saline vs VPA and the saline vs TPM comparisons. This analysis retrieved a single common gene: *Lrrc9*, which was also DM in the sham-operated vs saline comparison. However, lack of information about this gene precludes interpretation of this finding in relation to migraine susceptibility.

Validation of DMRs by bisulfite pyrosequencing. DNA bisulfite pyrosequencing (BPS) of 6 DMRs within genes *Itgav*, *Kcnd2*, *Pcdhb3* and *Rimbp2*, DM in the saline-VPA comparison, and within genes *Anks1b* and *Ndufs3*, DM in the saline-TPM comparison, was performed to validate MBD-sequencing data. 6 rat samples were used to validate each DMR, 3 from the saline group and 3 from the VPA or the TPM group. Consistent with the MBDS results, all DMRs showed differential methylation levels and these were in the same direction as in MBDS, except for DMRs within *Itgav* and *Rimbp2* genes, where no differences were detected between the saline and the VPA group (**Fig 3**).

DISCUSSION

This is the second experimental study addressing the role of epigenetic mechanisms in a migraine model. However, the first study compared the methylation of candidate genes involved in the generation of a migraine attack and examined the role of 17 β -estradiol in their methylation status.¹⁷ In our study, we have analyzed for the first time the genome-wide DNA methylation changes induced by CSD and by VPA and TPM pre-treatments in a CSD rat model.

Many studies have addressed the genetic component of migraine and identified several susceptibility factors.⁶⁻¹⁰ However, their results have been able to explain only a small proportion of the predisposition to the disorder. In the present work we tested the hypothesis that epigenetic changes could represent an alternative or additive factor in migraine susceptibility: a brain profile of genes amenable to methylation after a long-term treatment with migraine preventative drugs in the rat could provide clues towards genes potentially relevant to migraine in humans. In the same line, a recent review has proposed a model for migraine pathophysiology and chronification based on epigenetic mechanisms.¹⁶ The authors suggest that different factors such as sex hormones, inflammation, early life adversity, stress and neuronal activity can induce epigenetic mechanisms that modify gene expression and pathways related to migraine.

With the goal of identifying genes that would confer susceptibility to migraine in such a way, we performed a genome-wide DNA methylation analysis and selected those genes whose methylation status was modified by VPA, TPM or CSD in a rat migraine model. VPA and TPM are antiepileptic drugs effectively used in migraine prophylaxis.⁴⁴ Moreover, their chronic, but not acute, administration has been shown to suppress CSD in rats and cats.^{18, 19, 21} Our hypothesis was that both drugs would lower CSD susceptibility by inducing changes in the DNA methylation of specific genes in the cerebral cortex.

CSD is a slowly propagating wave of neuronal and glial depolarization followed by suppression of brain activity. Recently, the sensitization and activation of meningeal trigeminal afferents by CSD was demonstrated, providing the missing link between CSD and migraine pain.⁵ A previous genome-wide methylation analysis performed in mouse brain described for the first time that neuronal activity modifies the DNA methylation in brain.⁴⁵ Although the present study was designed to analyze the effects of VPA and TPM, we also wondered if CSD was able to induce DNA methylation changes in the cortex by itself. Interestingly, CSD modified the methylation status of genes involved in axon growth and guidance, *Cdh13* and *Ephb2*; in neurotransmission, *Asic2* and *Kif5a*; and in nociception, *Mrgprx3*; among others. The correct establishment of synapse connections, where axon growth and guidance and neuronal differentiation play an important role, is essential for the normal brain function. In fact, neuronal disorders such as epilepsy and autism are associated with unbalanced excitatory and inhibitory inputs in the neuronal network.⁴⁶ Migraine is thought to develop in hyperexcitable brains, a situation that could be caused by an impaired neuronal network development.⁴⁷ The effects of CSD on DNA methylation of genes involved in axon growth and guidance could be related to the neuronal network establishment. It is worth noting that CSD has modified the DNA methylation of a gene involved in nociception, a process tightly linked to migraine⁴⁸ and that might be impaired in an hyperexcitable brain or under abnormal neurotransmission circumstances. Sukhotinsky et

al. studied the changes induced by chronic daily CSDs in mouse cortex, mimicking frequent migraine attacks, in the susceptibility to suffer subsequent CSDs over time.⁴⁹ Surprisingly, their results showed that chronic daily CSD conditioning reduced CSD frequency, duration and propagation speed. Our hypothesis is that the effect of CSD on DNA methylation could be one of the reasons for this fact. Thereby considering those genes whose methylation is modified by CSD as possible susceptibility migraine candidate genes.

Several studies have shown that VPA is a histone deacetylase inhibitor (HDAC) and a promoter of DNA demethylation.³⁰ Specifically in neural tissue, it was shown to induce DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain after 3 days of treatment⁵⁰ and also in some genes of the Wnt/ β -catenin pathway in the prefrontal cortices and hippocampi after prenatal exposure in rats.⁵¹ In keeping, our results show a clear effect of VPA on DNA demethylation in the cerebral cortex of rat. Some of the genes found affected by VPA might be of interest as migraine susceptibility genes. Especially *Slc25a13* and *Slc38a1*, involved in glutamate transport; *Pcdhb3* and *Tcf4*, involved in neuronal differentiation; and *Asic2* and *Kcnd2*, involved in neurotransmission. Glutamate homeostasis has been widely linked to migraine. In fact, the role of glutamate in migraine was first described when its topical application was shown to induce CSD in experimental animals.⁵² Afterwards, several physiologic, genetic and clinical studies have provided indirect evidence for glutamatergic role in migraine.⁵³ It is worth noting that during CSD massive glutamate effluxes are believed to depolarize adjacent neurons to facilitate its spread.⁵⁴ Our results of VPA effects on DNA methylation of genes involved in glutamate transport provide a new link between this excitatory neurotransmitter and migraine. Moreover, impaired neurotransmission has been already directly linked to migraine since it is the cause of a rare monogenic subtype of migraine with aura, hemiplegic migraine.⁵⁵

TPM has been previously characterized as a HDAC inhibitor.³⁴ In this study we have shown for the first time its role on brain DNA methylation. Interestingly, TPM induced methylation changes in genes such as *Grip1*, *Lrrtm4*, *Wnt7a*, *Ankrd6*, *Anks1b*, *Arhgap17* and *Nell2*, involved in neural development and differentiation; *Rhobtb3*, which interacts with the serotonin receptor 5-HT₇. As discussed above, these functions are directly or indirectly linked to migraine pathophysiology.

Both drugs, as expected, reduced the frequency of CSDs. However, there were statistically significant differences only for the VPA group. This might indicate a better performance of VPA than TPM as a modulator of CSD frequency in our study; which is consistent with previous studies.¹⁹ No results were retrieved when comparing VPA and TPM effects on DNA methylation, suggesting that both drugs may suppress CSD by modifying different pathways.

One of the limitations of our study is that we used a rat model instead of using samples from migraineurs. Our goal was to detect DNA methylation changes specifically in the cerebral cortex, due to its relation with CSD and with the initiation of migraine attacks.⁵⁶ Furthermore, although some DNA methylation studies of neurological disorders have been carried out analyzing the DNA obtained from peripheral blood, there are discrepancies whether methylation status of both tissues can be correlated or not.⁵⁷ Moreover, some environmental factors are known to modify the DNA methylation status, which can be fully controlled when

using laboratory animals but not in human cohorts. Hence, due to the tissue specificity of DNA methylation, the difficulty to obtain cerebral cortical samples from patients and to control their environmental exposures, we used a highly validated animal model of migraine with aura to perform our analysis.

MBDS results were confirmed by BPS except for DMRs within *Itgavand Rimbp2* genes. Lack of differential methylation in the two referred instances could be explained because pyrosequencing assays did not include all the CpGs within DMRs and the fact that both DMRs were outside CGI, where DNA methylation is less predictable.

In summary, we have found DMRs in genes related to mechanisms that are involved in migraine pathophysiology, such as glutamate pathways, impaired neurotransmission and nociception; highlighting the importance of epigenetic mechanisms in migraine susceptibility. Although we have focused on VPA and TPM effects, it would be interesting to determine the effects on DNA methylation and other epigenetic mechanisms of other modulators of migraine, such as sex hormones and specific environmental factors. Moreover, we propose a new subset of genes as potential migraine susceptibility candidates. Overall, our results show for the first time a possible implication of epigenetic mechanisms in migraine susceptibility. Further studies analyzing the methylation status of genes found differentially methylated in our study in cohorts of migraine patients will strengthen their involvement on this common neurological pathology.

REFERENCES

1. Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain*. 1994 Feb;117 (Pt 1):199-210.
2. Leao. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1944;7:359-90.
3. Ayata C. Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache*. 2010 Apr;50(4):725-30.
4. Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*. 2010 Jun 30;30(26):8807-14.
5. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, et al. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science*. 2013 Mar 1;339(6123):1092-5.
6. Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet*. 2010 Oct;42(10):869-73.
7. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):912-7.
8. Chasman DI, Schurks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet*. 2011 Jul;43(7):695-8.
9. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet*. 2012 Jul;44(7):777-82.
10. Ligthart L, de Vries B, Smith AV, et al. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet*. 2011 Aug;19(8):901-7.
11. Le H, Tfelt-Hansen P, Skytthe A, Kyvik KO, Olesen J. Association between migraine, lifestyle and socioeconomic factors: a population-based cross-sectional study. *J Headache Pain*. 2011 Apr;12(2):157-72.
12. Dzoljic E, Vlajinac H, Sipetic S, Marinkovic J, Grbatinic I, Kostic V. A survey of female students with migraine: what is the influence of family history and lifestyle? *Int J Neurosci*. 2013 Sep 5.
13. Macgregor EA, Rosenberg JD, Kurth T. Sex-related differences in epidemiological and clinic-based headache studies. *Headache*. 2011 Jun;51(6):843-59.
14. Weng YL, An R, Shin J, Song H, Ming GL. DNA modifications and neurological disorders. *Neurotherapeutics*. 2013 Oct;10(4):556-67.
15. Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS. Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jan;38(1):167-82.
16. Eising E, N AD, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD. Epigenetic mechanisms in migraine: a promising avenue? *BMC Med*. 2013;11:26.
17. Labrujere S, Stolk L, Verbiest M, et al. Methylation of migraine-related genes in different tissues of the rat. *PLoS One*. 2014;9(3):e87616.
18. Akerman S, Goadsby PJ. Topiramate inhibits cortical spreading depression in rat and cat: impact in migraine aura. *Neuroreport*. 2005 Aug 22;16(12):1383-7.
19. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006 Apr;59(4):652-61.
20. Yan L, Wang Q, Fu Q, Ye Q, Xiao H, Wan Q. Amitriptyline inhibits currents and decreases the mRNA expression of voltage-gated sodium channels in cultured rat cortical neurons. *Brain Res*. 2010 Jun 8;1336:1-9.
21. Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, et al. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiol Dis*. 2010 Feb;41(2):430-5.
22. Eikermann-Haerter K, Can A, Ayata C. Pharmacological targeting of spreading depression in migraine. *Expert Rev Neurother*. 2012 Mar;12(3):297-306.

23. Chen H, Dzitoyeva S, Manev H. Effect of valproic acid on mitochondrial epigenetics. *Eur J Pharmacol.* 2012 Sep 5;690(1-3):51-9.
24. Boyadjieva N, Varadinova M. Epigenetics of psychoactive drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2012 Oct;64(10):1349-58.
25. Blaheta RA, Cinatl J, Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev.* 2002 Sep;22(5):492-511.
26. Watterson JM, Watson DG, Meyer EM, Lenox RH. A role for protein kinase C and its substrates in the action of valproic acid in the brain: implications for neural plasticity. *Brain Res.* 2002 Apr 26;934(1):69-80.
27. Arinze IJ, Kawai Y. Sp family of transcription factors is involved in valproic acid-induced expression of Galphai2. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):17785-91.
28. Wang JF, Shao L, Sun X, Young LT. Glutathione S-transferase is a novel target for mood stabilizing drugs in primary cultured neurons. *J Neurochem.* 2004 Mar;88(6):1477-84.
29. Bosetti F, Bell JM, Manickam P. Microarray analysis of rat brain gene expression after chronic administration of sodium valproate. *Brain Res Bull.* 2005 Apr 30;65(4):331-8.
30. Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M. Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis.* 2007 Mar;28(3):560-71.
31. Perisic T, Zimmermann N, Kirmeier T, et al. Valproate and amitriptyline exert common and divergent influences on global and gene promoter-specific chromatin modifications in rat primary astrocytes. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Feb;35(3):792-805.
32. Falchook GS, Fu S, Naing A, et al. Methylation and histone deacetylase inhibition in combination with platinum treatment in patients with advanced malignancies. *Invest New Drugs.* 2013 Oct;31(5):1192-200.
33. Asai T, Bundo M, Sugawara H, et al. Effect of mood stabilizers on DNA methylation in human neuroblastoma cells. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013 Aug 9:1-10.
34. Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia.* 2004 Jul;45(7):737-44.
35. Liang Y, She P, Wang X, Demarest K. The messenger RNA profiles in liver, hypothalamus, white adipose tissue, and skeletal muscle of female Zucker diabetic fatty rats after topiramate treatment. *Metabolism.* 2006 Oct;55(10):1411-9.
36. Li B, Zhang S, Li M, Zhang H, Hertz L, Peng L. Down-regulation of GluK2 kainate receptor expression by chronic treatment with mood-stabilizing anti-convulsants or lithium in cultured astrocytes and brain, but not in neurons. *Neuropharmacology.* 2009 Sep;57(4):375-85.
37. Chavez L, Jozefczuk J, Grimm C, et al. Computational analysis of genome-wide DNA methylation during the differentiation of human embryonic stem cells along the endodermal lineage. *Genome Res.* 2010 Oct;20(10):1441-50.
38. Mayol G, Martin-Subero JI, Rios J, et al. DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One.* 2012;7(11):e48401.
39. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3.
40. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W741-8.
41. Hu Y, Xu H, Li Z, et al. Comparison of the genome-wide DNA methylation profiles between fast-growing and slow-growing broilers. *PLoS One.* 2013;8(2):e56411.
42. Rodriguez BA, Frankhouser D, Murphy M, et al. Methods for high-throughput MethylCap-Seq data analysis. *BMC Genomics.* 2012;13 Suppl 6:S14.
43. Kulis M, Queiros AC, Beekman R, Martin-Subero JI. Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Aug 9;1829(11):1161-74.

44. Vikelis M, Rapoport AM. Role of antiepileptic drugs as preventive agents for migraine. *CNS Drugs*. 2010 Jan;24(1):21-33.
45. Guo JU, Ma DK, Mo H, et al. Neuronal activity modifies the DNA methylation landscape in the adult brain. *Nat Neurosci*. 2011 Oct;14(10):1345-51.
46. Terauchi A, Umemori H. Specific sets of intrinsic and extrinsic factors drive excitatory and inhibitory circuit formation. *Neuroscientist*. 2012 Jun;18(3):271-86.
47. D'Andrea G, D'Arrigo A, Dalle Carbonare M, Leon A. Pathogenesis of migraine: role of neuromodulators. *Headache*. 2012 Jul-Aug;52(7):1155-63.
48. Cregg R, Momin A, Rugiero F, Wood JN, Zhao J. Pain channelopathies. *J Physiol*. 2010 Jun 1;588(Pt 11):1897-904.
49. Sukhotinsky I, Dilekoz E, Wang Y, et al. Chronic daily cortical spreading depressions suppress spreading depression susceptibility. *Cephalalgia*. 2011 Dec;31(16):1601-8.
50. Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A. Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics*. 2010 Nov-Dec;5(8):730-5.
51. Wang Z, Xu L, Zhu X, et al. Demethylation of specific Wnt/beta-catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec (Hoboken)*. 2010 Nov;293(11):1947-53.
52. Fifkova E, Van Harreveld A. Glutamate and spreading depression. *J Neurobiol*. 1974;5(5):469-73.
53. Ramadan NM. Glutamate and migraine: From Ikeda to the 21st century. *Cephalalgia*. 2014 Feb;34(2):86-9.
54. Costa C, Tozzi A, Rainero I, et al. Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain*. 2013;14(1):62.
55. Russell MB, Ducros A. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2011 May;10(5):457-70.
56. Bolay H. The first phase of a migraine attack resides in the cortex. *J Neural Transm*. 2012 May;119(5):569-74.
57. Tylee DS, Kawaguchi DM, Glatt SJ. On the outside, looking in: a review and evaluation of the comparability of blood and brain "-omes". *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013 Oct;162B(7):595-603.

FIGURE LEGENDS

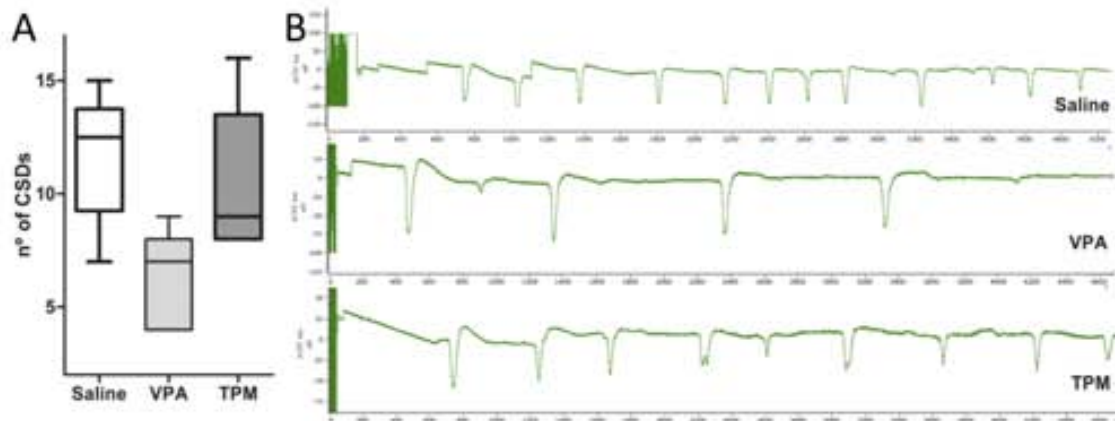


Figure 1. Results of CSD recordings. Boxplot of number of CSDs counted during 1 hour of KCl-induction in saline, VPA and TPM groups (A). Examples of cortical DC potential shifts recorded during 1 hour in one animal of the saline (12 CSDs), VPA (4 CSDs) and TPM groups (9 CSDs) (B).

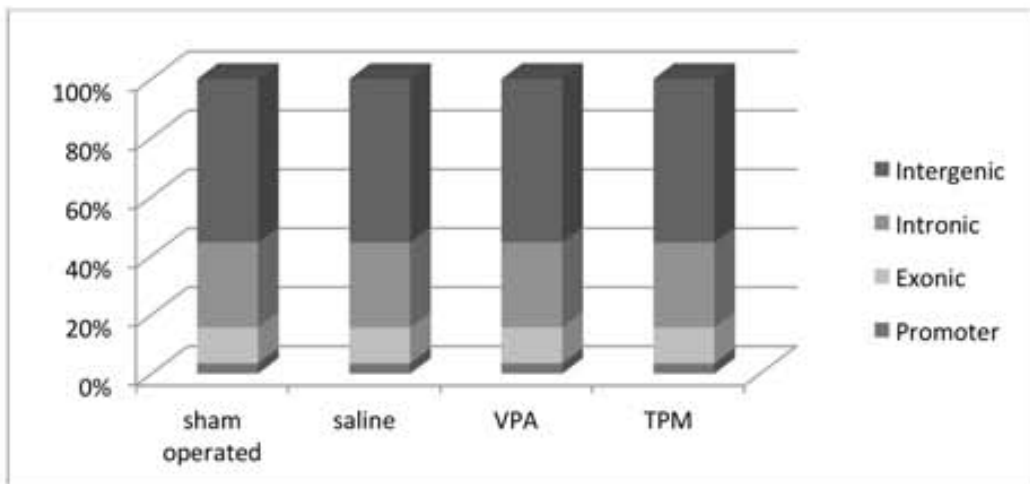


Figure 2. Genomic methylation distribution of the results obtained with MBDS. Bar graph showing percentages of DMRs classified between intergenic, intronic, exonic and promoter regions in the sham-operated, saline, VPA and TPM groups. There are no differences between the 4 groups. Approximately 55% of methylated regions were within intergenic regions, 28% within intronic regions, 12% within exonic regions and 3.5% within promoter regions.

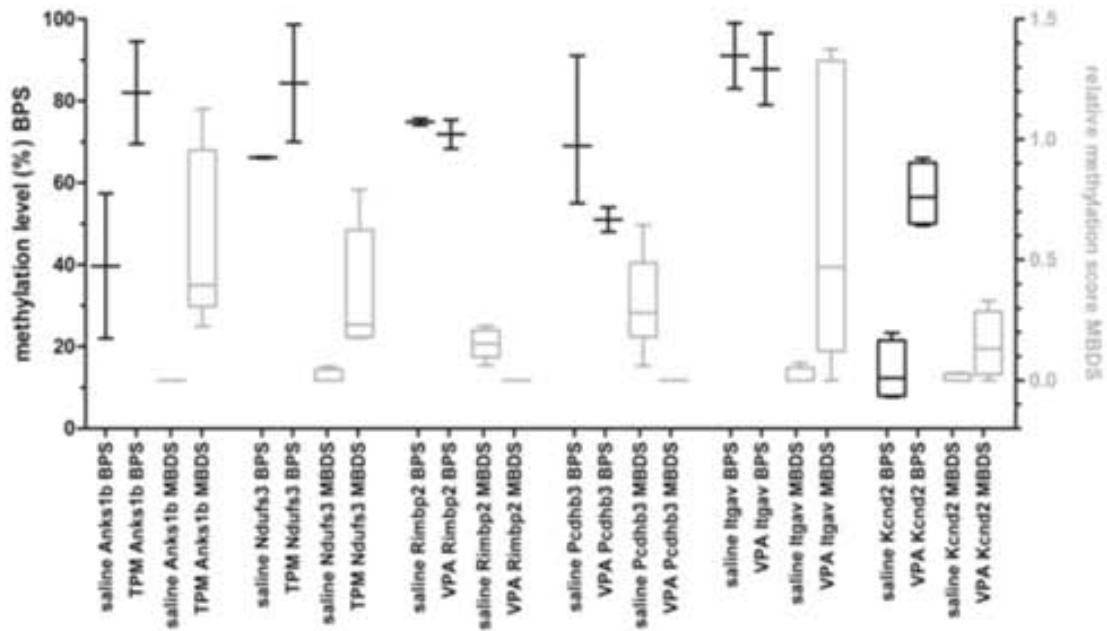


Figure 3. Boxplots showing methylation levels obtained by bisulfite pyrosequencing (BPS, in black) and relative methylation scores obtained by MBD-sequencing (MBDS, in gray). Results are grouped according to the DMR analyzed and the sequencing method used. Differences between saline and VPA or TPM were detected in all DMRs, except in *Ilgav* and *Kcnd2*. Taking into account that BPS and MBDS methylation results are indicated with different scores (% of methylation and relative methylation score), these boxplots show the same trend when comparing the results obtained with BPS and MBDS in all DMRs, except in *Ilgav*.

TABLES

Table 1. List of genes containing DMRs. Genes containing a DMR from the analysis of MBD5 results with MEDIPS software. "CSD effects" column contains the genes obtained when comparing results from sham-operated and saline groups; "VPA effects" column lists those genes emerging from saline and VPA group comparison; and "TPM effects" column shows those from saline and TPM group comparison. Genes in each comparison group are listed according to the group where they were found methylated (sham-operated, saline, VPA or TPM) and the region that contains the DMR (promoter or intragenic). P: promoter, I: intragenic (within described genes). ^d: distal promoter, ^p: proximal promoter.

CSD effects				VPA effects				TPM effects			
Sham-operated group		saline group		saline group		VPA group		saline group		TPM group	
P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
<i>Fcgr2a^d</i>	<i>Adams19</i>	<i>Ctvs1^d</i>	<i>Asic2</i>	<i>Pcdhb3^p</i>	<i>Afp</i>	<i>Fam229b^d</i>	<i>Asic2</i>	<i>Anks6^d</i>	<i>Arhgap15</i>	<i>Cide1^d</i>	<i>Ankrd6</i>
<i>Pde4d^d</i>	<i>Asic2</i>	<i>Mrgprx3^d</i>	<i>Cdrl3</i>		<i>Arl2</i>	<i>Fcgr2a^d</i>	<i>Col27a1</i>	<i>Blimh^d</i>	<i>Ccdc81</i>	<i>Ktbd4^d</i>	<i>Anks1b</i>
	<i>Btbd11</i>	<i>Rbm43^d</i>	<i>Dnahc8</i>		<i>Cd2ap</i>	<i>Nup88^d</i>	<i>Colec10</i>	<i>Ccdc59^d</i>	<i>Cko4</i>	<i>Pigh^d</i>	<i>Arhgap17</i>
	<i>Commd10</i>		<i>EBF1</i>		<i>Gucy1a2</i>		<i>Dupd1</i>		<i>Cyp7b1</i>		<i>Btn8</i>
	<i>Derl1</i>		<i>Hgf</i>		<i>Hps5</i>		<i>Ejfg3</i>		<i>Grip1</i>		<i>Lrrc69</i>
	<i>Ephb2</i>		<i>Iqck</i>		<i>Lect1</i>		<i>Fcgr2a</i>		<i>Ilnap</i>		<i>Lrrc9</i>
	<i>Fcgr2a</i>		<i>Klf5a</i>		<i>Lyp</i>		<i>Rgov</i>		<i>Jakmp3</i>		<i>Map3k13</i>
	<i>Herc2</i>		<i>Lhfp</i>		<i>Ltbp1</i>		<i>Kcnd2</i>		<i>Klh1</i>		<i>Ndufs3</i>
	<i>Lamp3</i>		<i>Masp10</i>		<i>Mtg1</i>		<i>Lin28b</i>		<i>Lrba</i>		<i>Nef2</i>
	<i>Lrrc9</i>		<i>Nlrp4a</i>		<i>Ndufs4</i>		<i>Lrrc9</i>		<i>Lrrtm4</i>		<i>RGD1565505</i>
	<i>Pah</i>		<i>Nlrp5</i>		<i>Nlrp4a</i>		<i>Pot1</i>		<i>Mcf2l</i>		<i>Rhobtb3</i>
	<i>Parp8</i>		<i>Parp8</i>		<i>Pde3a</i>		<i>Rpain</i>		<i>Mettl25</i>		<i>Rnf144a</i>
	<i>Rps27b2</i>		<i>Upp2</i>		<i>Plekha1</i>		<i>Tcf4</i>		<i>Piwil2</i>		<i>Scoc</i>
	<i>Slc2a9</i>		<i>Zfand6</i>		<i>Prr16</i>		<i>Thoda</i>		<i>Ppm1h</i>		<i>Tmem98</i>
	<i>Spata5</i>				<i>Rapgef5</i>		<i>Tmem132c</i>		<i>Rgs12</i>		
	<i>ST7</i>				<i>Rimbp2</i>		<i>Tube1</i>		<i>Spata16</i>		
	<i>Wfs1</i>				<i>Slc25a13</i>		<i>Zfp839</i>		<i>Thsd7b</i>		
					<i>Slc38a1</i>				<i>Trobd2b</i>		
					<i>Tmem130</i>				<i>Wnt7a</i>		

Table 2. List of potential candidate genes of the CSD effects. Genes selected from the comparison between sham-operated and saline groups. Only those genes whose function was linked to any of the migraine characteristics or other neurological syndromes and that were expressed in the CNS were selected as potential candidates of the CSD effects and listed in this table. Columns show information of gene symbol, gene function, expression in CNS and cellular localization. CNS: central nervous system; PM: plasma membrane; ER: endoplasmic reticulum; †: promoter.

Gene	Function	Expression in CNS	Localization
Hypermethylated at SHAM-OPERATED GROUP			
<i>Asic2</i>	Cation channel with high affinity for sodium; gated by extracellular protons and inhibited by amiloride. Plays a role in neurotransmission.	+	PM
<i>Ephb2</i>	Functions in axon guidance during development. Involved in the guidance of commissural axons that form a major interhemispheric connection between the 2 temporal lobes of the cerebral cortex; and of contralateral inner ear efferent growth cones at the midline and of retinal ganglion cell axons to the optic disk. Regulates dendritic spines development and maturation and stimulates the formation of excitatory synapses.	+	PM, axon, dendrite
<i>Herc2</i>	E3 ubiquitin-protein ligase that regulates ubiquitin-dependent retention of repair proteins on damaged chromosomes. Its defect may be responsible for an autism spectrum disorder, characterized by cognitive delay, autistic behavior and gait instability.	+	Cytoplasm, nucleus
<i>Pde4d</i>	Hydrolyzes the second messenger cAMP, which is a key regulator of many important physiological processes. Genetic variations might be associated with susceptibility to stroke.	+	Cytoplasm, PM, centrosome
<i>Wfs1</i>	Participates in the regulation of cellular Ca ²⁺ homeostasis, at least partly, by modulating the filling state of the endoplasmic reticulum Ca ²⁺ store. Mutations are associated with Wolfram syndrome, which affects the CNS; and autosomal dominant deafness 6 (DFNA6).	+	ER membrane
Hypermethylated at SALINE GROUP			
<i>Asic2</i>	Cation channel with high affinity for sodium. Gated by extracellular protons and inhibited by amiloride. Plays a role in neurotransmission.	+	PM
<i>Cdh23</i>	Negative regulator of axon growth during neural differentiation. Protects vascular endothelial cells from apoptosis due to oxidative stress and is associated with resistance to atherosclerosis.	+	PM
<i>Ctvs1</i> †	Required for normal morphology of late endosomes and/or lysosomes in neurons.	+	Golgi apparatus, PM, endosome membrane
<i>Dnalc8</i>	Exhibits ATP binding and microtubule motor activity.	+	Cilium axoneme
<i>EBF1</i>	Transcriptional activator involved in dopaminergic neurons development.	+	Nucleus
<i>Hgf</i>	Potent mitogen for mature parenchymal hepatocyte cells and growth factor for a broad spectrum of tissues and cell types. Acts as an activating ligand for the receptor tyrosine kinase MET by binding to it and promoting its dimerization. Its defect causes the deafness autosomal recessive type 39, a form of profound prelingual sensorineural hearing loss.	+	ND
<i>Kif5a</i>	Microtubule-dependent motor required for slow axonal transport of neurofilament proteins. Involved in GABA receptor mediated synaptic transmission.	+	Cytoplasm
<i>Mapk10</i>	Serine/threonine-protein kinase involved in various processes such as neuronal proliferation, differentiation, migration and apoptosis. Acts in the regulation of the β -amyloid precursor protein signaling during neuronal differentiation. Participates in neurite growth in spiral ganglion neurons.	+	Cytoplasm, PM, nucleus, mitochondrion
<i>Mrgprx3</i> †	Regulates nociceptor function and/or development, including the sensation or modulation of pain. Potently activated by enkephalins.	+	PM
		Trigeminal neurons	

Table 3. Results from the functional group over-representation analysis of genes containing DMRs by using GO, KEGG and IPA in the sham-operated vs saline group comparison. Results are divided into those genes methylated at sham-operated or saline group. Right column contains adjusted p-values, except in "IPA top networks" where IPA score is shown.

SHAM-OPERATED GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
ER unfolded protein response	0,0099
ER-associated protein catabolic process	0,0099
Cellular response to unfolded protein	0,0099
Cellular response to topologically incorrect protein	0,0099
ER-nucleus signaling pathway	0,0118
Ubiquitin-dependent protein catabolic process	0,0136
Response to unfolded protein	0,0136
Nerve development	0,0136
Response to endoplasmic reticulum stress	0,0136
Modification-dependent protein catabolic process	0,0136
Intrinsic to endoplasmic reticulum membrane	0,05
Integral to endoplasmic reticulum membrane	0,05
IPA top canonical pathways Adj p-value	
Tyrosine biosynthesis IV	0,0036
Phenylalanine degradation I	0,0045
Axonal guidance signaling	0,055
Retinoic acid mediated apoptosis signaling	0,056
IL-10 signaling	0,059
IPA top networks Score	
Drug metabolism, endocrine system development and function, lipid metabolism	48
Molecular transport, organismal injury, skeletal and muscular disorders	3
SALINE GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
Transferase activity	0,0054
Focal adhesion	0,0018
Pathways in cancer	0,0026
IPA top canonical pathways Adj p-value	
UVA-induced MAPK signaling	0,01
HGF signaling	0,015
Ga12/13 signaling	0,021
Signaling by Rho family GTPases	0,0079
IL-22 signaling	0,014
IPA top networks Score	
Cell Morphology, hematopoiesis, humoral immune response	28
Gene expression, cellular development, hair and skin development and function	4

Table 4. List of potential candidate genes of the VPA effects. Genes selected from the comparison between saline and VPA groups. Only those genes whose function was linked to any of the migraine characteristics or other neurological syndromes and that were expressed in the CNS were selected as potential candidates of the VPA effects and therefore listed in this table. Columns show information of gene symbol, gene function, expression in CNS and cellular localization. CNS: central nervous system; ^o: promoter.

Gene	Function	Expression in CNS	Localization
Hypermethylated at SALINE GROUP			
<i>Ltbp1</i>	Involved in the control, assembly, secretion and targeting of TGFβ1.	+ (cortex)	Extracellular matrix
<i>Plekha1</i>	Participates in phosphatidylinositol-3-kinase class I signaling pathway. Interacts with valproate.	+	Plasma membrane
<i>Rapgef5</i>	Involved in regulation of small GTPase mediated signal transduction.	+	Nucleus
<i>Rimbp2</i>	Plays a role in the synaptic transmission as bifunctional linker that interacts simultaneously with RIMS1, RIMS2, CACNA1D, CACNA1B and potentially with other Ca ²⁺ channel alpha-1 isoforms.	+	Plasma membrane Synapse
<i>Slc25o13</i>	Member of the mitochondrial carrier family. Catalyzes the exchange of aspartate for glutamate and a proton across the inner mitochondrial membrane and is stimulated by calcium on the external side of the inner mitochondrial membrane. Mutations in this gene result in citrullinemia type 2 (CTLN2), an autosomal recessive disease characterized primarily by elevated serum and urine citrulline levels and by neuropsychiatric symptoms including abnormal behaviors, loss of memory, seizures and coma.	+	Mitochondria
<i>Slc38o1</i>	Supplies glutamatergic and GABAergic neurons with glutamine which is required for the synthesis of the neurotransmitters glutamate and GABA.	+ (cortex)	Plasma membrane
<i>Pcdhb3^o</i>	Involved in the establishment and maintenance of specific neuronal connections in the brain.	+	Plasma membrane
Hypermethylated at VPA GROUP			
<i>Asic2</i>	Cation channel with high affinity for sodium. It is gated by extracellular protons and inhibited by amiloride. Plays a role in neurotransmission.	+	Plasma membrane
<i>Kcnd2</i>	Pore-forming subunit of voltage-gated rapidly inactivating A-type potassium channels. Prominent in the repolarization phase of the action potential. Generates tetramers with <i>Kcnd1</i> and/or <i>Kcnd3</i> .	+	Plasma membrane
<i>Tcf4</i>	This gene encodes transcription factor 4, a basic helix-loop-helix transcription factor. Involved in the initiation of neuronal differentiation. Defects in this gene are a cause of Pitt-Hopkins syndrome, an autism spectrum disorder.	+	Nucleus

Table 5. Results from the functional group over-representation analysis of genes containing DMRs by using GO, KEGG and IPA in saline vs VPA group comparison. Results are divided into those genes methylated at sham-operated or saline group. Right column contains adjusted p-values, except in "IPA top networks" where IPA score is shown.

SALINE GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
Purine metabolism	0,002
L-amino acid transport	0,0436
Cyclic-nucleotide-mediated signaling	0,0436
cAMP-mediated signaling	0,0436
Amino acid transmembrane transport	0,0436
L-amino acid transmembrane transporter activity	0,019
Amino acid transmembrane transporter activity	0,0285
Carboxylic acid transmembrane transporter activity	0,0327
Organic acid transmembrane transporter activity	0,0327
Organic anion transmembrane transporter activity	0,0327
IPA top canonical pathways Adj p-value	
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	0,0057
Relaxin Signaling	0,0064
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	0,03
tRNA Splicing	0,031
Phototransduction Pathway	0,047
IPA top networks	
Cardiovascular System Development and Function, Organismal Development, Tissue Morphology	57
VPA GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
Voltage-gated cation channel activity	0,0065
Voltage-gated channel activity	0,0065
Voltage-gated ion channel activity	0,0065
Cation channel activity	0,0137
Gated channel activity	0,0137
Ion gated channel activity	0,0137
Channel activity	0,0188
Ion channel activity	0,0188
Passive transmembrane transporter activity	0,0188
Metal ion transmembrane transporter activity	0,0188
IPA top canonical pathways Adj p-value	
Telomere Extension by Telomerase	0,012
Polyamine Regulation in Colon Cancer	0,018
Thyroid Cancer Signaling	0,033
Glioma Invasiveness Signaling	0,047
IL-10 Signaling	0,055
IPA top networks	
Cellular Compromise, Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities	27
Cellular Movement, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Hematological System Development and Function	13

Table 6. List of potential candidate genes of the TPM effects. Genes selected from the comparison between saline and TPM groups. Only those genes whose function was linked to any of the migraine characteristics or other neurological syndromes and that were expressed in the CNS were selected as potential candidates of the TPM effects and therefore listed in this table. Columns show information of gene symbol, gene function, expression in CNS and cellular localization. CNS: central nervous system; ND: not determined; PM: plasma membrane; ER: endoplasmic reticulum; P: promoter.

Gene	Function	Expression in CNS	Localization
Hypermethylated SALINE GROUP			
<i>Cicco4</i>	Protein involved in chloride channel activity.	+	PM
<i>Cyp7b1</i>	Protein involved in circadian rhythm, memory and response to cAMP. It participates in steroid hormone biosynthetic pathway and is associated with spastic paraplegia type 5A.	+	ER membrane, PM
<i>Grip1</i>	It binds to the liprin-alpha SVD2 family of proteins to mediate synaptic targeting of AMPA receptors and plays a role in presynaptic and postsynaptic maturation.	+	Postsynaptic PM, ER, cytoplasmic vesicle
<i>Il2rap</i>	Facilitates the binding between interleukin-1 and its receptor, which initiates signaling events that result in the activation of interleukin-1 responsive genes.	ND	PM
<i>Jakmip3</i>	It exhibits kinase and microtubule binding.	+	Golgi apparatus
<i>Kif2</i>	It plays a role in organizing the actin cytoskeleton of the brain cells, in the development of cerebellar Purkinje cell layer and in the dendrite development.	+	Cytoskeleton
<i>Lrrtm4</i>	It plays a role in the development and maintenance of the vertebrate nervous system. Exhibits strong synaptogenic activity, restricted to excitatory presynaptic differentiation. It is peripherally associated with AMPAR complex (AMPA-type glutamate receptor).	+	Postsynaptic PM
<i>Ppm1h</i>	It exhibits phosphoprotein phosphatase activity. It is hypothesized to be a component in the signal transduction pathway for neuronal growth inhibitory factors in CNS myelin.	+	Cytoplasm, PM
<i>Rgs12</i>	It acts as a GTPase activating protein for Gi class alpha subunits and plays a role in desensitization and inhibition of G-protein coupled receptor signaling. It participates G protein mediated signaling pathway and in calcium signaling pathway via the calcium-sensing receptor.	+	Nucleus
<i>Trobd2b</i>	Metalloprotease that acts as a negative regulator of the Wnt signaling pathway. Required for head formation.	ND	PM
<i>Wnt7a</i>	It is involved in synaptogenesis.	+	Extracellular matrix
Hypermethylated TPM GROUP			
<i>Ankrd5</i>	It is involved in neurogenesis and in the negative regulation of canonical Wnt receptor signaling pathway.	+	Cytoplasm, nucleus
<i>Anks1b</i>	It interacts with amyloid beta protein precursor (AbetaPP) and may have a role in normal brain development and in the pathogenesis of Alzheimer's disease.	+	Cytoplasm, nucleus, Cajal bodies
<i>Arhgap17</i>	Rho GTPase-activating protein involved in control of exocytosis and neurite outgrowth via induction of the reorganization of cortical actin filaments and in the organization of apical polarity in epithelial cells as well as cellular proliferation. It also plays a pivotal role in regulating the morphological differentiation of astrocytes.	+	Cytoplasm, PM
<i>Ndufs3</i>	It is one of the iron-sulfur protein components of mitochondrial NADH. It is involved in induction of apoptosis, negative regulation of cell growth and reactive oxygen species metabolic process. It participates in Alzheimer, Huntington and Parkinson disease pathways.	+	Mitochondrion inner membrane
<i>Nel2</i>	Glycoprotein involved in the growth and differentiation of neural cells. It exhibits heparin and protein kinase C binding. It is expressed in glutamatergic neurons but not in GABAergic neurons.	+	Cytoplasm, dendrite, extracellular space
<i>Rhobtb3</i>	Rho GTPase that exhibits ATP and RabGTPase binding and ATPase activity. It interacts with the serotonin receptor 5-HT7 and is involved in a wide variety of central nervous system functions, namely circadian rhythm, REM sleep, depression, thermoregulation, obsessive-compulsive disorder (OCD), anxiety, schizophrenia, epilepsy, nociception, migraine, sensation-seeking behavior, impulsivity, learning and memory.	+	Golgi apparatus
<i>Scoc</i>	Positive regulator of amino acid starvation-induced autophagy.	+	Golgi apparatus

Table 7. Results from the functional group over-representation analysis of genes containing DMRs by using GO, KEGG and IPA in saline vs TPM group comparison. Results are divided into those genes methylated at saline or TPM group. Right column contains adjusted p-values, except in "IPA top networks" where IPA score is shown and in "Functions over-represented" in TPM group where p-values are shown (all adjusted p-values were >0,05).

SALINE GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
GTPase regulator activity	0,0153
Nucleoside-triphosphatase regulator activity	0,0153
GTPase activator activity	0,0363
Small GTPase regulator activity	0,0489
IPA top canonical pathways Adj p-value	
Pregnenolone Biosynthesis	0,0052
Hepatic Cholestasis	0,0063
Histidine Degradation VI	0,0078
Ubiquinol-10 Biosynthesis (Eukaryotic)	0,01
Glutamate Receptor Signaling	0,05
IPA top networks	
	Score
Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease	35
Cell Cycle, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular Growth and Proliferation	7
Organismal Development, Infectious Disease, Cancer	3
Cell Cycle, Behavior, Cardiovascular Disease	2
TPM GROUP	
Functions over-represented Adj p-value	
Regulation of response to stimulus	0,0172
Biological regulation	0,0147
Regulation of growth	0,0283
Positive regulation of cell communication	0,0646
Dendrite	0,0308
Neuron projection	0,0911
IPA top canonical pathways Adj p-value	
CD27 Signaling in Lymphocytes	0,026
RANK Signaling in Osteoclasts	0,044
SAPK/JNK Signaling	0,048
HGF Signaling	0,051
NGF Signaling	0,054
IPA top networks	
	Score
Cell Morphology, Cellular Assembly and Organization, Cell Signaling	31
Molecular transport, organismal injury, skeletal and muscular disorders	3

DISCUSSIÓ

1. SEQÜENCIACIÓ DE GENS CANDIDATS EN TRASTORNS NEUROLÒGICS PAROXÍSTICS

A. LA CERCA DE NOUS GENS: QUIN N'ÉS L'OBJECTIU?

La cerca dels gens causants de les malalties genètiques té varis objectius que es poden classificar entre els objectius clínics i els objectius de la recerca.

Des d'un punt de vista clínic, l'objectiu principal és el diagnòstic genètic. Malauradament, el diagnòstic genètic no sempre implica la posterior aplicació d'un tractament, ja que la majoria de les malalties genètiques, especialment les rares, actualment no en disposen. Així doncs, el diagnòstic genètic primerament és una eina per tal de donar resposta al propi pacient. Saber quin és l'origen de la malaltia que hom pateix és un primer pas cap a l'acceptació d'aquesta i cap a la perspectiva d'arribar a disposar d'un tractament específic en un futur. A més a més, el diagnòstic genètic és una eina imprescindible a l'hora de realitzar el consell genètic en una família o bé en el moment en què una família decideix tenir un altre fill.

En el cas en que es trobin mutacions en un pacient es poden donar dues situacions:

- Els progenitors són portadors de la mutació. En aquest cas, el pacient ha heretat les mutacions dels seus pares. En el cas que es produeixi una nova gestació, s'hauria de procedir al diagnòstic prenatal per a determinar si el fetus ha heretat les mutacions dels seus progenitors.

- Els progenitors no són portadors de la mutació. En aquest cas, les mutacions del pacient s'han originat *de novo*. El risc de recurrència és molt baix, però és aconsellable realitzar un diagnòstic genètic en el cas de noves gestacions davant la possibilitat que existeixi un mosaicisme germinal en algun dels progenitors.

Des de la perspectiva de la recerca, trobar el gen causant d'una malaltia ofereix una aproximació per a entendre els mecanismes que l'originen, ofereix la possibilitat de desenvolupar nous tractaments i, a més a més, permet l'obtenció d'informació sobre la funció del propi gen.

B. MUTACIONS O POLIMORFISMES? PERJUDICIALS O NEUTRES?

El resultat de la seqüenciació d'un gen pot revelar la presència de variants en la seqüència d'aquest. Es poden trobar dos tipus de variants en la seqüència del genoma: les mutacions i els polimorfismes. La diferència entre ambdós termes és totalment arbitrària i rau només en el valor de la seva freqüència. Així, una variant que té una freqüència major o igual a l'1% es considera un polimorfisme i una variant que té una freqüència inferior a l'1% es considera una mutació. Aquesta definició genera controvèrsia, tant per l'arbitrarietat de la definició del llindar entre ambdós termes, com perquè la freqüència d'una variant depèn de

varis factors, ja sigui l'origen poblacional de l'individu que presenta la variant o bé el fet que aquella regió hagi estat seqüenciada en pocs individus de manera que la freqüència descrita no sigui representativa del conjunt de la població.

Sovint es tendeix a parlar de mutacions referint-se només a aquelles variants que tenen una conseqüència perjudicial sobre l'individu que la presenta. Cal remarcar, però, que les mutacions poden ser beneficioses, neutres o perjudicials. Existeixen diferents mètodes per a determinar-ne l'efecte. D'una banda, se'n pot inferir el seu efecte perjudicial en el cas que només es trobi en pacients i no en individus sans. També s'utilitzen programes de predicció de l'efecte de les mutacions, com per exemple els programes Polyphen-2 (Adzhubei et al., 2010) i MutationAssessor (Reva et al., 2007), la majoria dels quals analitzen la conservació evolutiva de la posició on s'ha produït la mutació tant en gens ortòlegs com paràlegs (com més conservada està una posició aminoacídica, més indispensable es considera per al correcte funcionament de la proteïna). Finalment, també es poden realitzar estudis funcionals de les mutacions per determinar si la proteïna codificada presenta una alteració en la seva funcionalitat, com en el cas de l'Article 1 i l'Annex 3, els quals poden implicar l'ús de tècniques molt diverses, com per exemple l'ús de models animals *knock-in* o *knock-out*.

Tant les prediccions com els estudis funcionals sempre s'han de considerar com a models, ja que en cap dels dos casos es tenen en compte la totalitat dels efectes dels factors que poden modular la mutació en concret. Per exemple, la tècnica més usada per a realitzar estudis funcionals de gens que codifiquen canals iònics és el *patch clamp in vitro*. Aquesta tècnica, que és la utilitzada en l'Article 1 i l'Annex 3, consisteix en expressar el canal mutat en una cèl·lula *in vitro* i determinar-ne les característiques electrofisiològiques comparant-lo amb el canal *wild-type*. Cal tenir en compte, però, que aquests estudis s'han realitzat en cèl·lules HEK 293, no en cèl·lules neurals; així els resultats obtinguts donen una visió aproximada de l'acció dels canals mutats, ja que no se sap si en l'ambient fisiològic normal on s'expressa el canal l'efecte és el mateix que en aquests models.

C. EL GEN *CACNA1A*: UN SOL GEN I UNA GRAN VARIABILITAT DE FENOTIPS

Les mutacions en el gen *CACNA1A* s'han relacionat amb diferents trastorns neurològics paroxístics (van den Maagdenberg et al., 2010). Entre ells, la migranya hemiplègica (MH) de tipus 1, l'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2), el torticolí paroxístic benigne del lactant (TPBL), l'atàxia espinocerebel·lar de tipus 6, les síndromes periòdiques de la infància i l'hemiplegia alternant de la infància (HAI).

i. El gen *CACNA1A* i la migranya hemiplègica

L'efecte principal de les mutacions en el gen *CACNA1A* que provoquen MH són de guany de funció del canal, per això s'esperaria que tinguessin conseqüències fenotípiques similars en els pacients portadors. En canvi, existeix una gran variabilitat fenotípica en els pacients portadors d'aquestes mutacions. Aquest fet es reflexa en la cohort de pacients estudiada a l'Annex 3 on podem veure que el pacient amb la mutació p.Ser218Leu presenta MH acompanyada d'edema cerebral transitori, convulsions generalitzades i afàsia perllongada; el pacient amb la mutació p.Thr501Met presenta MH i atàxia progressiva; el pacient amb la mutació p.Arg583Gln i els 4 individus afectes de la família presenten combinacions dels fenotips MH, EA2, atròfia cerebel·losa i MA; i el pacient amb la mutació p.Thr666Met presenta MH, MA i símptomes cerebel·losos.

També existeix variabilitat en relació a l'efecte d'una mateixa mutació en diferents pacients. Prenent d'exemple la mutació p.Thr666Met, que és la mutació més prevalent en individus amb MH, ens trobem fenotips que inclouen MH associada a atàxia cerebel·losa progressiva i coma (Wada et al., 2002; Choi et al., 2012), MH associada a encefalopatia aguda (Ohmura et al., 2012) i MH associada a nistagmus (Yabe et al., 2008), entre d'altres.

Les diferències fenotípiques existents entre els diferents pacients portadors de mutacions al gen *CACNA1A* es podrien deure a l'efecte de la penetrància incompleta o reduïda. Aquest efecte s'ha descrit en nombrosos casos que presenten malalties genètiques molt diverses. Probablement, la penetrància incompleta es deu a la combinació de varis

factors, tant genètics com ambientals. Entre els factors genètics podem destacar-ne l'expressió diferencial dels diferents al·lels, la influència moduladora de variants genètiques addicionals situades tant en *cis* com en *trans* i l'efecte de l'epigenètica (Cooper et al., 2013). També existeixen casos de penetrància incompleta lligats al sexe i/o a l'edat de l'individu. Un exemple que trobem a la literatura de penetrància incompleta deguda a l'efecte modulador de variants genètiques en *trans* involucra el gen *CACNA1A*. Es tracta d'un estudi realitzat amb pacients del síndrome de Dravet, portadors de mutacions en el gen *SCN1A*, als quals se'ls va determinar la presència o no de variants en el gen *CACNA1A* (Ohmori et al., 2013). Els resultats van indicar que els pacients que tenien tant mutacions en el gen *SCN1A* com variants en el gen *CACNA1A* presentaven diferències fenotípiques en relació amb els pacients sense variants al gen *CACNA1A*. D'aquest exemple en podem extreure la conclusió que tot i que les mutacions a *CACNA1A* lligades a MH siguin les causants de la malaltia, per a poder explicar completament el fenotip caldria informació sobre els diferents factors moduladors o modificadors genètics del gen *CACNA1A*. Actualment aquests moduladors es desconeixen. Per això, seria una interessant futura línia d'investigació.

ii. El gen *CACNA1A* i el torticolí paroxístic benigne del lactant

En l'estudi presentat a l'Article 1, es descriu la quarta mutació descrita al gen *CACNA1A* associada amb el torticolí paroxístic benigne del lactant (TPBL); concretament la mutació p.Glu533Lys. Aquesta mutació ha estat trobada en dos germans i la mare asimptomàtica i, anteriorment, s'havia descrit en una família d'EA2 (Scoggin et al., 2006). El germà petit va començar amb les crisis als 9 mesos de vida amb una freqüència de dues crisis al mes. Els episodis no duraven més de 5 minuts, s'acabaven amb la son i consistien en la torsió lateral del coll amb flexió ipsilateral del tronc i atàxia. La germana gran va experimentar crisis semblants entre els 13 mesos i els 3 anys d'edat. La freqüència, però, era mensual i la durada variava entre els 30 minuts i les 24 hores. La mare, portadora també de la mutació, es definia com asimptomàtica. Podria ser o bé que no hagués desenvolupat el TPBL degut a una penetrància incompleta de la mutació o bé que hagués desenvolupat el TPBL, però que

les crisis fossin tan lleus que els seus progenitors no els hi haguessin donat importància. Cal remarcar que en els diferents casos descrits en la literatura les crisis de TPBL acabaven desapareixent o bé evolucionant cap a un altre tipus de paroxismes amb el pas dels anys.

Els resultats de l'estudi funcional presentat a l'Article 1 de la mutació p.Glu533Lys en els canals de calci Cav2.1 expressats en cèl·lules HEK293, indiquen que aquesta mutació indueix una pèrdua de funció del canal mutat en comparació al canal *wild-type*. Els resultats dels estudis funcionals i de les prediccions funcionals de dues de les mutacions associades prèviament a TPBL, la mutació p.Tyr1854* i la p.Gln736*, indiquen també una pèrdua de funció del canal mutat (Graves et al., 2008), segurament degut al fet que provoquen l'aparició d'un codó STOP molt prematur, de manera que es pot preveure una resposta de degradació de l'ARN via *non-sense mediated decay*. Aquest tipus de resposta té com a conseqüència que la proteïna mutada no arribi a expressar-se, però que la dosi al·lèlica de la proteïna normal no sigui suficient per a assolir un funcionament normal (haploinsuficiència). L'efecte de l'altra mutació descrita, la p.Tyr1245Cys, provoca un guany de funció que resulta en una major activació del canal i a una menor inhibició d'aquest per les proteïnes G (Serra et al., 2009). Per tant, de les 4 mutacions descrites en TPBL, 3 d'elles provoquen una pèrdua de funció del canal i una provoca un guany de funció d'aquest.

Així doncs, tornem a trobar-nos en la situació en què diferents mutacions en el gen *CACNA1A* provoquen un mateix fenotip, en aquest cas TPBL. Contràriament al que s'ha descrit en MH, els estudis funcionals de les mutacions que causen TPBL demostren efectes oposats entre elles, ja que 3 són de pèrdua de funció i una de guany de funció. Aquest fet, així com també la desaparició de les crisis de TPBL a partir de certa edat, reforça la teoria que les mutacions en el gen *CACNA1A* presenten penetrància incompleta en el TPBL, igual que en la MH. Probablement aquest fet també indica la presència de factors moduladors del gen *CACNA1A*, els quals podrien ser genètics i/o epigenètics.

iii. El gen *CACNA1A* i l'hemiplegia alternant de la infància

En la cohort de pacients d'hemiplegia alternant de la infància (HAI) presentada a l'Article 2, la seqüenciació del gen *CACNA1A* va resultar negativa en tots els casos excepte en el pacient 366. Concretament, hi vam trobar la variant p.Ala454Thr, tant en la pacient com també en la mare asimptomàtica. Aquest canvi havia estat considerat inicialment com una variant polimòrfica amb una freqüència del 0,02 en la població control d'un estudi genètic realitzat en pacients de MH i EA2 (Ophoff et al., 1996). Més endavant, va associar-se a atàxia progressiva d'inici precoç (Cricchi et al., 2007). El nostre grup també va trobar aquest canvi en dos pacients que presentaven el fenotip més lleu en una família amb membres afectes de MH o MA (Serra et al., 2010). Les anàlisis funcionals *in vitro* realitzades en el mateix estudi van concloure que aquesta mutació redueix l'eficiència de secreció del canal; per això, en aquesta família es va considerar la mutació p.Ala454Thr com un preventiu de l'aparició d'aures motores. El pacient de HAI portador d'aquesta mutació també és portador d'una mutació en el gen *ATP1A3*. La nostra hipòtesi és que les conseqüències de la mutació del gen *ATP1A3* pot ser que siguin modulades per la variant trobada al gen *CACNA1A*, donant com a resultat l'aparició d'un fenotip de HAI més lleu. Així, la mutació del gen *ATP1A3* actuaria com a causant de la malaltia i la mutació del gen *CACNA1A* actuaria com a moduladora. Aquesta hipòtesi seria compatible amb el fet que la mare asimptomàtica també és portadora de la mutació al gen *CACNA1A*.

D. EL GEN *ATP1A3*: L'HEMIPLEGIA ALTERNANT DE LA INFÀNCIA I EL PARKINSONISME-DISTONIA D'INICI PRECOÇ

La cohort de 10 pacients de HAI presentada a l'Article 2 va ser seqüenciada pel gen *ATP1A3*. Es van trobar 3 mutacions que havien estat prèviament associades a HAI en 5 dels 10 pacients. Concretament, es va trobar la mutació p.Asp801Asn en el pacient 368, la mutació p.Glu815Lys en el pacient 386A i la mutació p.Gly947Arg en els pacients 337A, 366 i 532A.

Les mutacions p.Asp801Asn i p.Glu815Lys representen quasi el 70% de les mutacions causants de HAI trobades al gen *ATP1A3* (Heinzen et al., 2012; Rosewich et al., 2012; Høei-Hansen et al., 2013; Ishii et al., 2013). La mutació p.Gly947Arg només representa el 6,8% de les mutacions. La incidència de mutacions en el gen *ATP1A3* és menor en la nostra cohort; tot i això, les mutacions trobades coincideixen amb les més freqüents de les altres cohorts.

Un estudi recent ha analitzat si existeixen diferències fenotípiques en HAI en funció de la mutació present al gen *ATP1A3* en una cohort de 33 pacients japonesos (Ishii et al., 2013). Per a realitzar l'estudi, van dividir la cohort en 3 grups: un primer grup de 12 individus amb la mutació p.Asp801Asn, un segon de 10 individus amb la mutació p.Glu815Lys i el darrer grup de 11 individus amb 10 mutacions diferents. La comparació dels diferents trets fenotípics entre els 3 grups de pacients va permetre concloure als autors que els individus portadors de la mutació p.Glu815Lys són els que desenvolupen un fenotip més greu; que la mutació p.Asp801Asn provoca una forma més lleu de HAI i que, de les altres mutacions, la p.Gly755Ala, la p.Gly755Ser i la p.Ser137Tyr també provoquen un fenotip greu, però les altres 7 provoquen un fenotip relativament lleu. Aquests resultats són interessants, però caldria una cohort més gran de pacients per a poder establir una bona relació genotip-fenotip en la HAI. En relació a la nostra cohort, tot i ser més petita, existeix una concordança amb els resultats d'aquest estudi. Els pacients amb la mutació p.Gly947Arg presenten un retard mental entre lleu i moderat, en canvi el pacient amb la mutació p.Glu815Lys presenta un greu retard psicomotor.

Mutacions en el gen *ATP1A3* també són responsables del parkinsonisme-distonía d'origen precoç (DYT12). Aquesta malaltia és menys severa que la HAI, probablement degut a que l'origen dels símptomes és més tardà. Els símptomes més comuns de la DYT12 són els motors, predominantment la distonía i el parkinsonisme, però també se n'han descrit de cognitius i psiquiàtrics, i segueixen un patró continu, a diferència de la HAI que presenta un patró episòdic (Brashear et al., 2014). S'han realitzat estudis funcionals que semblen concloure que les mutacions en el gen *ATP1A3* que provoquen HAI modulen l'activitat de l'enzim i les que

provoquen DYT12 disminueixen l'activitat del canal degut a una menor expressió proteica (Heinzen et al., 2012).

E. EL GEN *PRRT2*: DE LA DISCINÈSIA PAROXÍSTICA CINE-SIGÈNICA A LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA

En la cohort de pacients analitzada a l'Annex 1, hi trobem 5 casos familiars i 5 casos esporàdics de DPC. L'anàlisi genètica de *PRRT2* va permetre la identificació de mutacions en 8 dels 10 casos. En concordança amb els resultats previs, 7 dels 8 pacients amb mutació presentaven un canvi en la posició c.649. Concretament, es va trobar la mutació c.649dupC en 3 casos familiars i 2 casos esporàdics, la mutació c.649delC en 1 cas esporàdic i les mutacions c.649dupC i c.649delC en 1 cas familiar. El darrer pacient amb mutació era un cas familiar que presentava una mutació nova, la c.219_220delGA, la qual també provoca l'aparició d'un codó STOP prematur (p.E73Dfs*60). Aquesta família presentava DPC i d'altres símptomes paroxístics com convulsions infantils i epilèpsia generalitzada en l'adult, però també trastorn obsessivocompulsiu (TOC) en alguns dels individus portadors de la mutació. Si bé es pot especular que aquest darrer trastorn pot ser secundari a un altre factor genètic, la coincidència de dos símptomes que són reconeguts com de disfunció dels ganglis basals (TOC i discinèsia) en una mateixa família, fa pensar en una etiologia comuna.

Pel que fa als casos sense mutació, ambdós són casos esporàdics. Segons els estudis publicats, els casos familiars són els que presenten una taxa de mutació a *PRRT2* més elevada. Tenint en compte els fenotips DPC, ICCA i BFIS, la taxa de mutació en casos familiars representa el 88%, en canvi en casos esporàdics representa el 34% (Pringsheim et al., 2010). En la nostra cohort, però, hem descrit una taxa de mutació més elevada: presenten mutació el 100% dels casos familiars i el 60% dels casos esporàdics.

El pacient amb les mutacions c.649dupC i c.649delC representa el segon cas descrit en la literatura amb mutació en homozigosi en el gen *PRRT2*. El primer cas que es va descriure, el qual tenia la mutació c.649dupC en homozigosi, presentava un fenotip més greu de DPC que incloïa retard mental, atàxia episòdica i crisis d'absències (Labate et al.,

2012). El pacient de la nostra cohort també presenta un fenotip més greu que el d'altres individus afectes, el qual inclou característiques fenotípiques de l'espectre autista.

Ens trobem amb un altre cas on diferents mutacions en un mateix gen, en aquest cas el gen *PRRT2*, i fins i tot una mateixa mutació d'aquest, la duplicació c.649dupC, provoquen una gran variabilitat de fenotips. A l'apartat 1.g.iv es descriu la relació entre el gen *PRRT2* i la MH.

F. EL GEN *SLC2A1* I EL DÈFICIT DE GLUCOSA CEREBRAL

En la cohort de 5 pacients analitzada a l'Annex 2 vam trobar 3 mutacions diferents en el gen *SLC2A1* en 3 dels 5 pacients seqüenciats: una mutació puntual de canvi de sentit (c.667C>T, p.Arg223Trp), una deleció que inclou tot l'exó 1 i una deleció de 2 nucleòtids que provoca una mutació sense sentit (c.710_711delGA, p.Val237Valfs*2), totes elles mutacions *de novo*.

La gran majoria de mutacions descrites en el gen *SLC2A1* es troben en casos esporàdics, per tant són mutacions *de novo*; igual que passa a la nostra cohort. Aquest fet es deu a que la majoria de casos presenten una greu discapacitat que els dificulta la possibilitat de tenir descendència. En relació al tipus de mutacions, s'han descrit grans delecions, mutacions de canvi de sentit, mutacions sense sentit, mutacions de canvi en la pauta de lectura i mutacions que afecten el lloc de *splicing*. Tot i l'interès en establir una relació genotip/fenotip, els resultats indiquen que, igual que en altres malalties genètiques, existeix una gran variabilitat fenotípica fins i tot en pacients portadors de la mateixa mutació (Leen et al., 2010). Aquest fet suggereix que deuen existir altres mecanismes, com per exemple gens modificadors, que alteren el fenotip i que també podrien contribuir en la fisiopatologia d'aquesta malaltia.

La presència de casos negatius en els cribratges mutacionals del gen *SLC2A1*, suggereix que podrien existir altres gens involucrats en aquesta malaltia. L'estudi de l'exoma sencer d'aquests individus podria permetre la troballa d'aquests possibles nous gens (De Giorgis and Veggiotti, 2013).

G. L'HETEROGENEÏTAT GENÈTICA DE LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA

i. La migranya hemiplègica i el gen *ATP1A2*

En la cohort de 18 pacients amb migranya hemiplègica (MH) analitzada a l'Annex 3, s'han trobat 2 mutacions en el gen *ATP1A2* en 2 casos familiars. La mutació p.Ala606Thr, la qual havia estat prèviament associada a MH en 3 famílies diferents (Riant et al., 2005; Lee et al., 2007); i la mutació p.Glu825Lys que va ser descrita per primera vegada en la nostra cohort. Els estudis funcionals d'aquesta darrera van concloure que la proteïna mutant probablement era menys estable que la *wild-type*, ja que l'expressió es trobava reduïda. Així mateix, aquests estudis van mostrar una baixa supervivència en front la ouabaïna de les cèl·lules transfectades amb els constructes mutats, indicant una disfunció de la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa amb la mutació p.Glu825Lys en la seva unitat alfa 2 o bé suggerint de nou una situació d'haploinsuficiència.

Aquests resultats indiquen que les mutacions associades a MH en el gen *ATP1A2* són menys freqüents que en el gen *CACNA1A*, si més no en la nostra població, i que es troben majoritàriament en casos familiars de MH.

ii. La migranya hemiplègica i el gen *SCN1A*

En la cohort de 20 pacients de MH seqüenciats pel gen *SCN1A* a l'Annex 4 només vam trobar una mutació en un dels pacients. Concretament, una mutació que no havia estat prèviament descrita, la c.4981T>C (p.Phe1661Leu). Tot i això, hi ha una mutació descrita en el mateix codó, la c.4982T>C, que provoca una substitució aminoacídica diferent (p.Phe1661Ser). Aquesta mutació va ser trobada en un pacient amb el síndrome de Dravet, un subtipus d'epilèpsia (Claes et al., 2003). En ambdós casos la fenilalanina de la posició 1661, la qual forma part de la regió citoplasmàtica que uneix els segments formadors del porus del canal, és substituïda per un altre aminoàcid. Segurament la diferència fenotípica existent entre els portadors d'ambdues mutacions rau en les diferents característiques bioquímiques dels aminoàcids que la substitueixen. La serina és un aminoàcid molt petit i polar, en canvi la leucina és un aminoàcid més

voluminós i hidrofòbic. El fet que s'hagi descrit una mutació en el mateix codó, tot i que amb un resultat fenotípic diferent, reforça la hipòtesi que la mutació trobada en el pacient de MH de la nostra cohort sigui patogènica, ja que malauradament no vam poder demostrar-ne la cosegregació en els familiars afectes d'aquest individu degut a que no vam poder disposar del seu ADN.

El fet que només s'hagi descrit una mutació en el gen *SCN1A* en la cohort de 20 pacients de MH analitzada, indica que les mutacions associades a MH es troben localitzades amb menor freqüència en el gen *SCN1A*, en comparació amb els gens *ATP1A2* i *CACNA1A*.

iii. La migranya hemiplègica i el gen *PRRT2*

El baix nombre de mutacions descrites en el gen *PRRT2* associades a MH va fer que decidísim no realitzar el cribratge mutacional d'aquest gen en la nostra cohort de pacients de MH.

iv. La cerca de nous gens en migranya hemiplègica

Existeix una gran proporció d'individus afectes de MH que resten sense diagnòstic genètic, ja que la seqüenciació dels gens *CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* i *PRRT2* en resulta negativa. D'una banda, podria ser que existissin mutacions en aquests gens que no són seqüenciades degut a que, per exemple, cauen en zones reguladores o en zones d'*splicing*, o bé podria ser que existissin grans reordenaments, com insercions i delecions, que no poden ser detectades mitjançant les tècniques de seqüenciació majoritàriament usades, si no que caldria utilitzar tècniques específiques com per exemple el MLPA. Aquests tipus de mutacions, però, probablement només explicarien una proporció molt baixa dels casos negatius; tal i com es veu reflexat en els resultats obtinguts en aquest tipus d'estudis realitzats en les nostres cohorts de pacients.

D'altra banda, l'ús de tècniques de seqüenciació a gran escala, com per exemple la seqüenciació de tot l'exoma o de tot el genoma, ajudaria a resoldre els casos negatius i així poder trobar nous gens associats a MH. Aquest és el plantejament que ens vam fer a l'hora de seqüenciar

l'exoma d'un dels sis individus afectes d'una família multigeneracional amb MH. Tot i això, la seqüenciació de l'exoma en aquest individu no ens va permetre identificar la variant genètica associada a MH en aquesta família.

Els resultats negatius de la seqüenciació de l'exoma es poden deure a diferents motius. D'una banda, els xips usats en la seqüenciació de l'exoma han anat millorant molt des que es va començar a usar aquesta tècnica. Les noves versions van millorant la cobertura, de manera que una mateixa regió es seqüencia més vegades per evitar la presència tant de resultats falsos positius com de falsos negatius, i també van incorporant més regions exòniques, més gens i més zones adjacents als gens que poden resultar importants per a la regulació d'aquests. Per això podria ser que la variant que causi la MH en aquesta família es trobi localitzada en una zona que no estigués inclosa o bé que es trobés poc coberta en el xip que vam utilitzar. També és important remarcar que un dels punts febles de la seqüenciació de l'exoma és que les regions difícils d'amplificar amb les tècniques convencionals, com per exemple les regions riques en guanines i citosines, normalment també donen problemes amb aquesta tècnica i, en nombroses ocasions, no se n'obté la seqüència. També hi ha exons de varis gens que tenen una cobertura nul·la. Així doncs, la seqüenciació de l'exoma no permet descartar totalment que la variant no es trobi localitzada en una regió exònica.

A part de l'explicació que ens dóna la pròpia metodologia, una de les mancances del nostre estudi és que només hem analitzat un individu de la família. Aquest fet es deu a que aquest estudi es va realitzar poc després que la seqüenciació de l'exoma estés disponible i el seu preu era unes 12 vegades superior al preu actual.

Existeixen diferents metodologies per a trobar nous gens candidats causants d'una malaltia mitjançant l'anàlisi de l'exoma. Una d'elles és seqüenciar diferents individus d'una mateixa família. Per exemple, en el cas que els pares no siguin afectes i el fill sí, es seqüencien els 3 individus i s'analitzen les variants que el fill té *de novo*, en els casos on es suposa herència dominant (Veeramah et al., 2013). En el cas de la família amb MH, el pare del cas índex també és afecte. L'estratègia que es podria seguir seria se-

qüenciar l'exoma d'un altre individu afecte que estigués el més allunyat possible dins l'arbre genealògic; d'aquesta manera compartirien un menor nombre de variants, les quals s'haurien d'analitzar per a determinar-ne la variant candidata. Fins i tot també es podrien analitzar individus sans per tal de descartar com a causants les variants compartides amb ells. En el nostre cas, hem inclòs un individu afecte de la mateixa família, el cosí germà del cas índex (l'individu 2.33), en un projecte de seqüenciació de l'exoma en MH dins el marc del *International Headache Genetics Consortium*. Aquest projecte utilitza una estratègia diferent de les que hem plantejat fins ara. De moment s'hi han inclòs 77 mostres de MH, de les quals 42 corresponen a casos familiars i 35 a casos esporàdics. L'objectiu és seqüenciar l'exoma de tots els pacients i buscar gens que presentin variants en varis dels pacients seqüenciats. Aquest tipus d'estudi es pot realitzar en els casos en els que es disposa d'un gran nombre d'individus afectes d'una mateixa malaltia. Actualment, l'estudi està en marxa i no en sabem els resultats. Un cop tinguem l'individu de la nostra família seqüenciat, paral·lelament al projecte del Consorci, realitzarem un estudi comparatiu entre els dos individus de la família per tal d'intentar trobar la variant causant de la MH en aquesta família.

H. MECANISMES MUTACIONALS

A la taula 19 es resumeixen els pacients inclosos en els cribratges mutacionals d'aquesta tesi que han resultat positius per la presència de mutacions. En els casos familiars, només s'ha inclòs el cas índex. La taula també recull les mutacions identificades en cada cas i la informació molecular de cadascuna d'elles.

PACIENT	GEN	FENOTIP	MUTACIÓ				
			EXÓ	cADN	PROTEÏNA	CONTEXT CpG	DE NOVO
486A	CACNA1A	TPBL	12	c.1597G>A	p.Glu533Lys	Sí	No
337A	ATP1A3	HAI	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	Sí	Sí
366	ATP1A3	HAI	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	Sí	Sí
	CACNA1A	HAI	11	c.1360G>A	p.Ala454Thr	Sí	No
368	ATP1A3	HAI	17	c.2401G>A	p.Asp801Asn	Sí	ND
386A	ATP1A3	HAI	18	c.2443G>A	p.Glu815Lys	Sí	Sí
532A	ATP1A3	HAI	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	Sí	Sí
NP30-1	PRRT2	DPC/ICCA	2	c.219_220delGA	p.Glu73Aspfs*60	No	No
482E	PRRT2	DPC/EpA	2	c.649dupC	p.Arg217Profs*8	Sí	No
NP24-1	PRRT2	DPC	2	c.649dupC	p.Arg217Profs*8	Sí	ND
NP25-1	PRRT2	DPC	2	c.649delC	p.Arg217Glufs*12	Sí	Sí
NP26-1	PRRT2	DPC	2	c.649dupC	p.Arg217Profs*8	Sí	No
NP58	PRRT2	DPC/EAu	2	c.649dupC/c.649delC	p.Arg217Profs*8/p.Arg217Glufs*12	Sí	No
NP120	PRRT2	DPC	2	c.649dupC	p.Arg217Profs*8	Sí	ND
NP98	PRRT2	DPC	2	c.649dupC	p.Arg217Profs*8	Sí	ND
444	SLC2A1	GLUT1DS	5	c.667C>T	p.Arg223Trp	Sí	Sí
NP63	SLC2A1	GLUT1DS	Deleció exó 1	-	-	No	Sí
NP85	SLC2A1	GLUT1DS	6	c.710_711delGA	p.Val237Valfs*2	No	Sí
391A	CACNA1A	MH	5	c.653C>T	p.Ser218Leu	Sí	Sí
A03_44	CACNA1A	MH	11	c.1502C>T	p.Thr501Met	Sí	Sí
A00_100	CACNA1A	MH	13	c.1748G>A	p.Arg583Gln	Sí	No
322B	CACNA1A	MH	17	c.1997C>T	p.Thr666Met	Sí	No
387A	ATP1A2	MH	18	c.2473G>A	p.Glu825Lys	No	No
I310	ATP1A2	MH	13	c.1816G>A	p.Ala606Thr	Sí	No
475	SCN1A	MH	26	c.4981T>C	p.Phe1661Leu	No	ND

Taula 19. Resum de les mutacions trobades en els diferents estudis genètics presentats en aquesta tesi. TPBL: trastorn paroxístic benigne del lactant; HAI: hemiplegia alternant de la infància; DPC: discinèsia paroxística cinesigènica; ICCA: convulsions infantils i coreoatetosi; EpA: epilèpsia en adults; EAu: espectre autista; GLUT1DS: síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1; ND: no determinat

De tots els pacients analitzats, hem trobat un total de 26 mutacions. D'aquestes, 15 són mutacions puntuals, concretament transicions (G>A, C>T, T>C); 5 són delecions, en dos casos d'un sol nucleòtid (C), en dos altres casos del dinucleòtid GA i en un cas d'un exó sencer; i 6 casos són duplicacions d'un sol nucleòtid (C).

Les transicions són canvis d'una base nitrogenada per una altra del mateix tipus, és a dir, una pirimidina per una altra (C↔T) o una purina per una altra (A↔G). Totes les mutacions puntuals trobades en les nostres cohorts de pacients són transicions. A més a més, totes, excepte dues, es donen en el context del dinucleòtid CG. Aquest resultat és consistent amb estudis mutacionals previs, on s'ha vist que les transicions són més comunes que les transversions. Aquest fet, anomenat "biaix de transicions", es deu principalment a que la gran majoria de citosines dels dinucleòtids CG es troben metilades, és a dir, en forma de 5-metilcitosina; i s'ha descrit que existeix una elevada incidència de la desaminació espontània de la 5-metilcitosina (Nakken et al., 2010), canvi químic que comporta la transició de la citosina cap a la timina. Fet que originaria les transicions.

De les altres mutacions podem destacar-ne la duplicació c.649dupC. Com hem comentat a l'apartat 1.e de la DISCUSSIÓ, aquesta mutació es dona en un *hotspot*. Els *hotspots* són regions del genoma on la taxa de mutació observada és més alta que l'esperada; normalment degut a que són regions inestables. En el cas de la mutació c.649dupC, es dona en una regió on hi ha 9 citosines seguides, fet que probablement provoca una major taxa d'error de l'enzim polimerasa.

I. TRACTAMENTS EN LES MALALTIES GENÈTIQUES: LA TERÀPIA GÈNICA

L'objectiu principal de trobar la mutació causant en un pacient afectat per una malaltia d'origen genètic no és determinar el tractament específic a seguir, ja que en moltes d'aquestes malalties no es disposa de cap tractament. Tot i això, cal remarcar que s'estan produint avenços importants en el camp de la teràpia gènica, fet que resultarà de gran ajuda per aquestes malalties en un futur proper.

La base metodològica de la teràpia gènica rau en introduir el gen sa en el pacient portador de la mutació, de manera que el producte d'aquest gen alleugi el defecte causat pel gen mutat o bé directament aturi la progressió de la malaltia. El principal obstacle d'aquesta teràpia és el transport del gen sa fins al teixit i la cèl·lula diana. Actualment, l'aproximació que està aportant els millors resultats és l'ús de retrovirus modificats genèticament que infecten la cèl·lula diana i hi insereixen el gen sa que se'ls hi ha introduït prèviament (Verma, 2013). Actualment, de les malalties que hem tractat en aquesta tesi no n'hi ha cap que disposi de teràpia gènica. No obstant, hi ha estratègies, com per exemple la restauració de la transcripció de codons STOP mitjançant els anomenats fàrmacs "*read-through*" o "inhibidors de la *non-sense mediated RNA decay*", que tenen un caràcter transversal i que probablement tenen potencial per ajudar a mitigar moltes malalties monogèniques. En aquests casos, la identificació de la mutació i la caracterització del nucleòtid exacte on es produeix l'errada són determinants per a poder plantejar aquest tipus de noves teràpies. Actualment ja hi ha assajos clínics en algunes malalties degeneratives amb aquest enfocament.

El coneixement de la fisiopatologia d'una malaltia també pot comportar la troballa d'un tractament específic per tal de combatre-la. N'és un exemple la síndrome de la deficiència del transportador de glucosa. En aquesta malaltia es recepta una dieta cetogènica aconseguint així una important millora dels seus efectes.

2. LA MIGRANYA COMUNA: UNA MALALTIA COMPLEXA

A. LA MIGRANYA COMUNA: UNA MALALTIA GENÈTICA COMPLEXA

Fins ara hem parlat de malalties monogèniques, com són la migranya hemiplègica i el trastorn per dèficit del transportador de glucosa GLUT1. La causa de les malalties monogèniques és la presència de mutacions en un sol gen. En canvi, existeixen diferents evidències que suggereixen que l'origen genètic de la migranya rau en l'efecte de varis gens (Wessman et al., 2007). Per això, la migranya comuna es defineix com una malaltia genètica complexa.

L'origen genètic de la migranya comuna ha estat analitzat en diferents estudis utilitzant diferents aproximacions metodològiques. S'han usat estudis de lligament genètic, seqüenciació de gens candidats, estudis d'associació genètica a gens candidats i estudis d'associació a nivell genòmic tant de variants comunes (GWAS) com de variants rares (Exome chip). Els resultats obtinguts mitjançant aquests estudis han permès identificar *loci* associats a migranya, però no han aconseguit definir la totalitat de la complexitat genètica de la migranya comuna.

B. L'HETEROGENEÏTAT CLÍNICA DE LA MIGRANYA

La migranya és una malaltia neurològica que engloba un gran espectre fenotípic clínic. Tot i que els migranyosos comparteixen els criteris diagnòstics que els defineixen com a tal, existeix una gran variabilitat clínica en la majoria dels aspectes de la malaltia.

La característica clínica més important de la migranya que permet dividir els pacients en dos grups és la presència o l'absència d'aures migranyoses. Actualment, el debat de si ambdues formes de migranya corresponen a variacions d'una sola entitat clínica o si bé corresponen a dues entitats clíniques diferenciades, encara està obert (Manzoni and Torelli, 2008; Purdy, 2008). Un dels punts que cal considerar en aquest debat és que, sovint, els pacients que tenen migranya amb aura també tenen crisis de migranya sense aura: aquest fet sembla que reforçaria la teoria que amb-

dós grups corresponen a una sola entitat. A més a més, també existeix el dubte de si els migranyosos sense aura experimenten o no el que s'ha anomenat "aura silenciosa", la qual es desenvoluparia en àrees de l'escorça cerebral que no implicarien l'aparició de símptomes capaços de ser percebuts pel pacient (Pietrobon and Striessnig, 2003).

Un altre dels aspectes clínics més importants en la migranya és la freqüència de les crisis. Aquesta característica ha fet que clínics i investigadors classifiquin els migranyosos en dos grups principals: aquells que presenten migranya episòdica i aquells que presenten migranya crònica. L'establiment dels criteris de classificació entre els dos grups ha provocat una gran discrepància en els darrers anys, ja que era necessari establir un llindar, totalment arbitrari, entre ambdós grups. Finalment la ICHD-III β ha definit la migranya crònica com una cefalea que es dona 15 o més dies al mes, com a mínim durant 3 mesos, dels quals un mínim de 8 dies s'han de complir els criteris diagnòstics de la migranya (ja sigui amb o sense aura). És important remarcar que moltes de les definicions establertes per la ICHD-III β tenen com a objectiu homogeneïtzar els pacients tant com sigui possible amb finalitats d'investigació, fet que ha representat el punt de partida de molts estudis productius. És evident, però, un cert grau d'arbitrarietat inevitable en els criteris establerts que provoca que en la pràctica clínica sovint els pacients es moguin d'un grup a un altre, pateixen símptomes aïllats sense complir tots els criteris diagnòstics o bé comparteixen signes i símptomes de diversos tipus de cefalea, desafiant totes les categories diagnòstiques.

Altres aspectes fenotípics importants que incrementen l'heterogeneïtat clínica de la migranya inclouen la gravetat de les crisis, la presència d'un tipus o altre de factors desencadenants, l'existència o no de pròdroms i l'efecte dels diferents tractaments. Tots aquests aspectes augmenten la dificultat de l'estudi de la migranya. D'una banda obren el debat de si la majoria dels pacients amb migranya tenen una base genètica i fisiopatològica comuna o si bé comparteixen d'una base diferent, però que convergeix en la mateixa simptomatologia. També és important remarcar que la descripció de la simptomatologia de la migranya es veu influenciada per la subjectivitat de cadascun dels

pacients i que, a més a més, és explicada al clínic de forma retrospectiva. Aquest darrer aspecte, però, es pot solucionar amb l'ús de diaris i calendaris on el pacient anota les característiques de les diferents crisis en el moment en què les pateix (Torelli and Jensen, 2010).

C. LA BASE GENÈTICA DE LA MIGRANYA

i. Consideracions sobre els resultats del GWAS en migranya sense aura

L'estudi GWAS realitzat en la cohort de pacients amb migranya sense aura (MO), presentat a l'Annex 6, va permetre la identificació de diferents *loci* associats a MO. Aquest fet el va convertir en el primer estudi d'aquestes característiques, ja que anteriorment s'havien publicat estudis GWAS però en mostres diferents: el primer analitzava una mostra clínica de pacients amb migranya amb aura (Anttila et al., 2010) i el segon una mostra poblacional de migranya (Chasman et al., 2011).

Per a determinar l'efecte de les variants trobades associades a migranya, igual que en qualsevol altra malaltia, es calcula el valor de la *odds ratio* (OR) per a cadascuna d'elles. La OR és una mesura estadística que quantifica la força de l'associació estadística entre una exposició o un factor de risc i una malaltia: representa la probabilitat que es doni una malaltia en presència d'aquesta exposició, comparant la probabilitat que es doni aquesta malaltia en absència d'aquesta exposició. Per tant, les variants trobades associades a migranya en un GWAS representen factors de risc per aquesta malaltia. Així, les OR indiquen el valor d'aquest factor de risc. En els casos on la $OR = 1$, es considera que la variant no és un factor de risc per la malaltia; en els casos on la $OR > 1$, la variant és un factor de risc per la malaltia; i en els casos on la $OR < 1$, la variant és un factor protector per la malaltia (Szumilas, 2010). Les OR de les variants associades a MO en el GWAS presentaven valors bastant propers a 1, fet que indica que el seu efecte sobre la migranya és interessant, tot i que no és molt potent.

Un altre consideració important sobre els resultats del GWAS és la manca d'estudis funcionals de les variants

trobades associades a la malaltia. Per a aprofundir en l'efecte de les variants trobades, s'hauria de determinar quin efecte tenen tant en *cis*, és a dir, en les regions genòmiques situades a menys d'una megabase, com en *trans*, és a dir, en les regions situades a més d'una megabase. En el cas on els resultats dels estudis funcionals són negatius, cal considerar les variants que es troben en desequilibri de lligament amb la variant trobada, ja que podrien ser aquestes les causants de la malaltia (Edwards et al., 2013).

Un altre punt que caldria remarcar d'aquest estudi d'associació és que la metodologia usada en el diagnòstic, en ser un estudi multicèntric internacional amb cohorts històriques, segurament difereix entre els diferents centres on s'han reclutat els pacients i els individus control. Per això, seria convenient realitzar uns criteris d'inclusió, tant dels individus afectes com dels controls, i uns qüestionaris comuns entre els diferents grups involucrats en l'estudi de la genètica de la migranya per als propers estudis genètics.

ii. Consideracions generals sobre els GWAS realitzats en migranya

En relació als diferents GWAS realitzats en migranya (Anttila et al., 2010; Chasman et al., 2011; Freilinger et al., 2012; Anttila et al., 2013), caldria considerar diferents aspectes que probablement han influït en la manca de resultats més potents i definitius. Aquests aspectes podrien ser considerats per a futurs GWAS realitzats en migranya.

Com hem comentat a l'apartat anterior, la caracterització fenotípica dels pacients s'hauria de realitzar seguint patrons idèntics per tal de partir d'una mostra poblacional més homogènia.

També en relació amb la caracterització fenotípica dels pacients, seria interessant realitzar les anàlisis estadístiques en subgrups de la mostra poblacional en funció dels diferents aspectes clínics de la migranya. D'aquesta manera la mostra poblacional seria encara més homogènia i, tot i que la mida es veuria reduïda, els resultats probablement serien més consistents. Es podrien classificar els pacients en funció de la freqüència de les crisis, del sexe (per tenir en

compte els efectes hormonals), dels factors que provoquen les crisis i de l'existència o no d'història clínica familiar, entre d'altres. Aquesta classificació només podria realitzar-se en els casos on s'hagués recollit informació completa de les crisis dels pacients i d'una forma homogènia entre els diferents centres de reclutament, per poder disposar de la mateixa informació de totes les cohorts.

També, com a consideració general de tots els GWAS, s'ha de remarcar que tot i que inclouen l'anàlisi de centenars de milers de variants conegudes i comunes (Schurks, 2012), la major part del genoma no està inclosa. Tot i que, com hem comentat, les variants incloses estan en desequilibri de lligament amb d'altres variants, fet que provoca que aquestes també hi estiguin representades indirectament.

iii. Consideracions generals sobre els estudis *Exome chip* en migranya

Una nova aproximació que actualment s'està duent a terme en l'estudi genètic de la migranya, tot i que encara no s'han publicat resultats, és l'ús dels arrays de variants exòmiques rares: els *Exome chip*. D'aquesta manera, l'anàlisi d'una mateixa mostra poblacional mitjançant un GWAS i mitjançant els arrays de variants exòmiques rares, permetria analitzar tant variants comunes com variants rares. Fins fa poc només es considerava la teoria que les malalties comunes es devien a l'efecte de variants comunes de baix impacte. La manca de resultats que expliquin la complexitat genètica tant de la migranya com d'altres malalties comunes, ha obert el plantejament que hi estiguin implicades variants genètiques rares de baix impacte (Manolio et al., 2009).

El fet que els arrays de variants exòmiques rares incloguin variants molt poc comunes obliga a que la mostra poblacional estudiada sigui molt gran per a poder trobar-les suficientment representades. Això, però, es contraposaria amb el fet de dividir els pacients migranyosos en subgrups que comparteixin característiques fenotípiques més enllà de les generals.

D. LA BASE EPIGENÈTICA DE LA MIGRANYA

La migranya és una malaltia amb una important base genètica, però que a més a més es veu altament influenciada per l'efecte de diversos factors ambientals, tant interns com externs (Friedman and De ver Dye, 2009). Una possible hipòtesi de l'efecte en la susceptibilitat de la migranya d'aquests factors és que actuin sobre diferents mecanismes epigenètics (Eising et al., 2013a). Els resultats obtinguts fins ara per tal de determinar el component genètic de la migranya només han estat capaços d'explicar una petita part de la base genètica d'aquesta malaltia; l'efecte dels factors epigenètics podria explicar la resta (Edwards et al., 2013). Recentment s'ha publicat una revisió on es proposa un model epigenètic per tal d'explicar la fisiopatologia i la cronificació de la migranya (Eising et al., 2013a). Els autors d'aquest treball suggereixen que diferents factors com són les hormones sexuals, la inflamació, l'adversitat en els primers anys de vida, l'estrès i l'activitat neuronal poden induir l'acció de mecanismes epigenètics que modifiquen l'expressió gènica afectant vies que estan relacionades amb la migranya.

L'epigenètica engloba diferents mecanismes que són la metilació de l'ADN, la modificació de les histones, la remodelació dels nucleosomes i l'acció dels ARNs no codificants. Fins ara no s'ha realitzat cap estudi amb l'objectiu de determinar el paper de l'epigenètica en la migranya. Existeixen varis motius metodològics que podrien explicar aquest fet.

D'una banda, les tècniques per analitzar els mecanismes epigenètics a nivell genòmic són bastant recents. Aquests permeten realitzar anàlisis sense haver de partir d'una hipòtesi prèvia. En el cas de la migranya, tot i que existeixen diversos gens candidats, l'anàlisi de l'epigenètica a nivell genòmic seria la millor aproximació per tal d'establir una primera relació entre aquest mecanisme i la malaltia.

Tot i que l'epigenètica és un terme que s'utilitza des de fa més de mig segle, la comprensió de la complexitat dels diferents mecanismes que hi estan involucrats encara queda lluny. Un exemple n'és el mecanisme epigenètic més ben estudiat fins al moment: la metilació de l'ADN. La majoria d'estudis de la metilació de l'ADN s'han basat en

analitzar la metilació de les regions promotores dels gens, establint la relació de que en presència de metilació, hi ha absència d'expressió gènica (Inbar-Feigenberg et al., 2013). Estudis de la metilació a nivell genòmic suggereixen, però, que la metilació a nivell de promotors sembla ser una part molt poc significativa de la totalitat d'aquest mecanisme epigenètic. Així, es comença a parlar de la importància de la metilació intragènica (Kulis et al., 2013), la qual sembla que actuaria de forma oposada a la metilació en promotors, i de la metilació intergènica, la qual es creu que podria tenir diferents efectes en funció de la regió genòmica metilada (Portela and Esteller, 2010).

Un dels factors que possiblement també ha influenciat en que no s'hagin realitzat estudis epigenètics en migranya és el fet que els trets epigenètics varien en funció del tipus cel·lular i tissular (De Bustos et al., 2009) i que, a més a més, no són marques fixes, és a dir que poden anar variant al llarg del temps degut a l'efecte de diferents factors. Així, tenint en compte que la migranya és una malaltia neurològica, el teixit que s'hauria d'estudiar per tal d'establir una relació entre l'efecte dels mecanismes epigenètics i la migranya és el sistema nerviós. Lògicament, l'obtenció de teixit cerebral humà és molt difícil. A més a més, per a poder realitzar un estudi metodològicament correcte caldria obtenir teixit de la mateixa regió cerebral en tots els pacients, fet que encara complica més l'obtenció de les mostres.

i. Consideracions sobre els resultats de l'estudi de metilació de l'ADN en un model de migranya

En aquest apartat remarcarem els diferents punts clau de l'estudi de metilació de l'ADN en un model de migranya en rata (Annex 7).

Ús del model de DCP

El primer punt que cal tractar és l'ús del model de rata enlloc de l'ús de mostres humanes. La justificació rau en que el nostre objectiu era determinar canvis en el còrtex cerebral, degut a la seva relació amb la DCP i amb la iniciació de les crisis migranyoses (Bolay, 2012). Tot i que alguns estudis de metilació de l'ADN de determinades

malalties neurològiques s'han dut a terme analitzant l'ADN obtingut de sang perifèrica, existeixen discrepàncies sobre si es poden correlacionar o no els resultats obtinguts en ambdós teixits (Ghosh et al., 2010). Així, l'ús del model ens va permetre treballar amb mostres de còrtex on prèviament hi havíem induït, o no, DCPs.

A més a més, el fet d'utilitzar un model permet controlar l'exposició a factors ambientals que podrien modificar l'estat de la metilació de l'ADN.

Ús de rates mascles

En aquest estudi vam utilitzar rates mascles de la soca Sprague-Dawley. El model ha estat validat en nombroses publicacions usant aquesta soca d'animals (Ayata et al., 2006; Summ et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Vam decidir usar només rates mascles ja que l'efecte de les hormones sexuals modifica la susceptibilitat a patir migranya (Accioly et al., 2012). A més a més, en el cas que haguéssim usat rates del sexe femení, hauríem d'haver determinat en quin moment exacte del cicle hormonal es trobava cadascuna de les rates per tal d'evitar al màxim la variabilitat provocada per aquest fenomen.

Tractament

El tractament escollit va ser l'àcid valproic i el topiramamat. Els motius van ser d'una banda que ambdós tractaments s'utilitzen com a preventius de migranya (Boyadjieva and Varadinova, 2012), també que disminueixen la freqüència de DCPs en models animals quan són administrats de forma crònica (Ayata et al., 2006) i, a més a més, que tenen un paper en l'epigenètica (Milutinovic et al., 2007; Dong et al., 2010; Wang et al., 2010)(Milutinovic et al., 2007).

El fet que s'utilitzin com a preventius de migranya indica que actuen sobre factors que disminueixen la susceptibilitat a patir migranya. A més a més, la necessitat de ser administrats de forma crònica per a ser efectius ens va fer hipotetitzar sobre el seu paper en la metilació de l'ADN, ja que l'efecte sobre aquest mecanisme requereix una exposició més o menys llarga, però no només puntual. El

seu efecte sobre la DCP semblava indicar que potenciaven canvis a nivell de còrtex cerebral. Una hipòtesi que ens va atraure va ser la de que els gens susceptibles de metil·lació pels fàrmacs potser també ho podien ser per factors ambientals al llarg de la vida, especialment durant el desenvolupament del cervell, o potser simplement poden contenir polimorfismes que augmentin la predisposició al fenotip. En conseqüència, els resultats d'aquest grup d'experiments podien resultar rellevants per a l'estudi dels mecanismes a través dels quals l'ambient condiciona la susceptibilitat a la migranya en l'humà.

Vam establir la durada del tractament en 4 setmanes perquè en estudis anteriors era el moment on es veia un major efecte sobre les DCPs en ambdós tractaments (Ayata et al., 2006).

Grups d'animals i comparacions de l'estudi

Com en la majoria d'estudis, existeix una limitació econòmica que impossibilita utilitzar un nombre molt gran d'animals i de grups diferents. Així, en el disseny experimental s'optimitza el nombre d'animals i grups analitzats i les condicions que es podran estudiar amb aquests. Els grups usats en el nostre estudi estan esquematitzats a la figura 19. Tal i com s'hi veu representat, l'estudi va constar de 36 rates dividides en 4 grups: el grup sham-operated, el grup sèrum + DCP, el grup valproic + DCP i el grup topiramant + DCP.

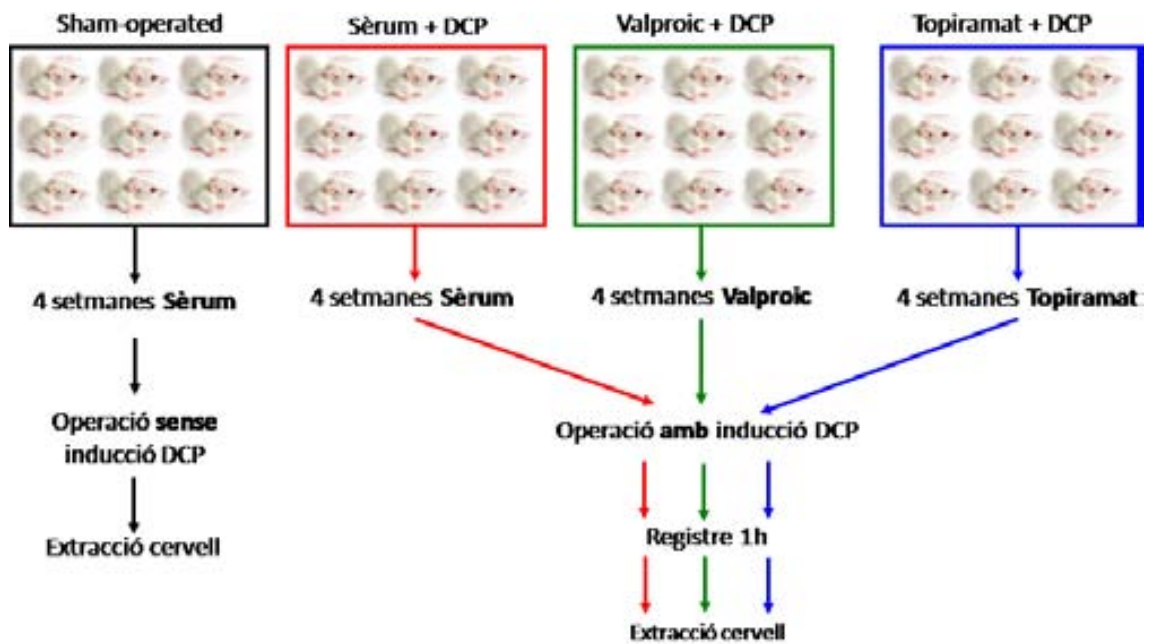


Figura 19. Representació esquemàtica dels grups usats en l'estudi de metil·lació de l'ADN en un model de migranya. Els 4 grups van constar de 9 rates cadascun, les quals van ser injectades amb sèrum, àcid valproic o topiramant. El grup sham-operated representa el control de l'operació, ja que la rata és operada sense que hi hagi inducció de DCP. Als altres grups se'ls van induir DCPs mitjançant l'aplicació tòpica de potassi durant una hora.

Dels 9 animals de cada grup, 6 d'ells van ser seleccionats arbitràriament per a realitzar-ne l'estudi de metilació genòmic de l'ADN. Els 3 animals restants van ser utilitzats en la fase de replicació, juntament amb 3 dels animals usats inicialment.

Un cop obtinguts els resultats de la metilació de l'ADN vam realitzar les següents comparacions:

- Comparació sham-operated vs sèrum: la diferència entre ambdós grups és el desenvolupament o no de DCPs. Així, els resultats obtinguts en aquesta comparació indiquen els efectes de la DCP sobre la metilació de l'ADN.
- Comparació sèrum vs valproic: la diferència entre ambdós grups és el tractament amb àcid valproic. Així, els resultats obtinguts indiquen els efectes de l'àcid valproic sobre la metilació de l'ADN.
- Comparació sèrum vs topiramàt: la diferència entre ambdós grups també és el tractament, en aquest cas, el topiramàt. Els resultats indiquen els efectes del topiramàt sobre la metilació de l'ADN.

Depressió cortical propagant (DCP)

La DCP pot ser induïda de diferents maneres: mecànicament, mitjançant la introducció d'un objecte punxegut en el còrtex; elèctricament, aplicant estímuls elèctrics en el còrtex; o químicament, aplicant potassi al còrtex. Vam decidir utilitzar la inducció química ja que estudis previs havien demostrat que era la metodologia que presentava menys variabilitat (Ayata et al., 2006). Tot i això, els animals de cadascun dels grups van presentar una freqüència diferent de DCPs, fet que ha introduït variabilitat en el nostre estudi.

També cal remarcar que se suposa que en humans es desenvolupa una sola DCP abans de cada crisi migranyosa. Els animals del nostre model que van ser induïts per tenir DCPs, en van desenvolupar un mínim de 4, en el cas d'una rata tractada amb àcid valproic, i un màxim de 16, en el cas d'una rata tractada amb topiramàt. El fet de desenvolupar més d'una DCP s'allunya doncs de la fisiopatologia real de

la migranya. Aquest fet el podríem haver solucionat usant la inducció mecànica: una punxada en el còrtex induïx una sola DCP. Aquest mètode, però, a part de presentar més variabilitat, no permetria determinar clarament l'efecte preventiu dels tractaments usats. A més a més, el fet d'haver desenvolupat varies DCPs probablement amplifica els efectes provocats per aquestes, de manera que aquests són més fàcilment detectables.

Mostres utilitzades

Les DCPs van ser induïdes en el còrtex dret de l'animal. En una cohort diferent d'animals vam comprovar que les DCPs només es desenvolupaven en el còrtex on aplicàvem el potassi, resultats que concorden amb els publicats posteriorment per un altre grup (Unekawa et al., 2013). Per això vam decidir utilitzar els còrtex on havíem aplicat el potassi per a extreure'n l'ADN que seria analitzat posteriorment. Els còrtex no induïts amb potassi van ser emmagatzemats per a futurs estudis.

Els còrtex van ser sotmesos a l'aplicació de potassi durant una hora i posteriorment van ser extrets. Vam determinar la durada de l'aplicació del potassi durant una hora i no més per reduir al màxim la mortalitat dels animals. De fet, la mortalitat en aquest estudi va ser nul·la. Tot i això, probablement no vam donar suficient temps perquè s'activessin determinades vies d'expressió gènica i encara menys de metilació de l'ADN. Així, si el moment de l'extracció del còrtex hagués estat més tard, probablement hauríem observat diferències de metilació en d'altres regions genòmiques i també hauríem detectat més canvis d'expressió gènica. Hagués estat interessant, doncs, poder analitzar l'estat de metilació de l'ADN en diferents moments per a poder comparar l'efecte al llarg del temps. Aquest fet, però, hagués suposat un augment important del nombre d'animals usats.

Ús de la tècnica MBD-seq

Vam decidir utilitzar la tècnica MBD-seq per tal d'analitzar la metilació de l'ADN a nivell genòmic (Serre et al., 2010). Aquesta tècnica consta d'un primer pas on es sonica l'ADN genòmic per tal d'obtenir fragments d'uns 300pb. Segui-

dament es realitza un pas d'enriquiment de l'ADN metilat mitjançant l'ús de proteïnes d'unió a grups metil: així, s'elueix i es descarta l'ADN no metilat i es conserva l'ADN que es troba metilat. El darrer pas consisteix en seqüenciar l'ADN metilat. Els resultats obtinguts de la seqüenciació indiquen que les regions que són seqüenciades corresponen a les regions metilades i les regions de les quals no se n'obté seqüència corresponen a regions no metilades.

Aquesta tècnica té els seus avantatges i els seus inconvenients. D'una banda, permet realitzar un estudi de metilació a nivell genòmic a un preu raonable, ja que només es seqüencia l'ADN que està metilat, no tot el genoma. A més a més, dels diferents mètodes d'enriquiment existents, l'enriquiment per unió a grups metil és el que presenta menys falsos positius i negatius, ja que les proteïnes amb dominis d'unió a grups metil presenten una major especificitat que els altres mètodes existents (Harris et al., 2010). El major inconvenient d'aquesta tècnica és que la detecció de la metilació es realitza de forma indirecta. A més a més, no es pot concretar ni quines ni quantes CpGs estan metilades, ja que les seqüències obtingudes tenen una llargada de 300pb, degut a la mida obtinguda en la sonicació inicial. Així, els resultats obtinguts indiquen que dins d'aquests fragments de 300pb hi ha 1 o més CpGs que es troben metilades.

Distribució genòmica de les regions diferencialment metilades

Els resultats obtinguts de les diferents comparacions van indicar que la majoria de les regions diferencialment metilades es trobaven en regions intergèniques. La metilació intergènica ha estat molt poc estudiada. Es creu que té un paper important en l'acció dels reguladors que actuen en *trans* i també en la regulació de l'estabilitat genòmica, impedint que s'expressin seqüències repetitives que podrien transposar-se i recombinar-se en d'altres regions genòmiques (Portela and Esteller, 2010)=.

La nostra anàlisi es va centrar bàsicament en les regions diferencialment metilades situades en regions promotores o en regions intragèniques. Vam analitzar només aquestes regions ja que l'objectiu principal del nostre estudi era trobar gens que estiguessin relacionats amb la suscepti-

ilitat de la migranya; també perquè encara existeix una gran mancança en l'anotació de les regions genòmiques funcionals situades en regions intergèniques en la rata.

La metilació de les regions promotores està relacionada amb la manca d'expressió gènica; en canvi, la metilació intragènica sembla que actuaria oposadament, és a dir, promovent l'expressió gènica (Portela and Esteller, 2010; Kulis et al., 2013). Per això hem analitzat separatament les regions diferencialment metilades en promotors i en regions intragèniques.

Determinació dels gens candidats de la susceptibilitat a patir migranya

Per a determinar quins gens podrien ser candidats a modificar la susceptibilitat a patir migranya, vam seguir dues estratègies diferents.

D'una banda, vam recopilar la informació relativa a la funció, l'expressió i la relació amb malalties d'origen neurològic de cadascun dels gens amb regions diferencialment metilades. Aquells que realitzaven una funció que podia estar relacionada amb la fisiopatologia de la migranya, que s'expressaven al sistema nerviós central i/o que estaven relacionats amb l'origen d'una malaltia neurològica, van ser considerats com a potencials candidats. En el cas dels efectes de la DCP vam trobar varis gens potencialment candidats, concretament els gens *Asic2*, *Ephb2*, *Herc2*, *Pde4d*, *Wfs1*, *Cdh13*, *Clvs1*, *Dnahc8*, *Ebf1*, *Hgf*, *Kif5a*, *Mapk10* i *Mrgprx3*. En el cas dels efectes de l'àcid valproic vam trobar els següents gens candidats: *Ltbp1*, *Plekha1*, *Rapgef5*, *Rimbp2*, *Slc25a13*, *Slc38a1*, *Pcdhb3*, *Asic2*, *Kcnd2* i *Tcf4*. I en el cas dels efectes del topiramà vam trobar els següents gens candidats: *Clca4*, *Cyp7b1*, *Grip1*, *Il1rap*, *Jakmip3*, *Klhl1*, *Lrrtm4*, *Ppm1h*, *Rgs12*, *Trabd2b*, *Wnt7a*, *Ankrd6*, *Arhgap17*, *Ndufs3*, *Nell2*, *Rhobtb3* i *Scoc*.

A més a més, els gens que contenien regions diferencialment metilades van ser analitzats mitjançant els softwares GO i KEGG per determinar si alguna via resultava enriquida, és a dir, si alguna via contenia varis gens amb regions diferencialment metilades. També van ser analitzats mitjançant el software IPA per tal de determinar les

relacions existents entre ells. Tot i que el nombre de gens usat en cada anàlisi no era suficientment alt per tal de poder establir correlacions significativament importants, vam trobar sobrerepresentades tant vies com funcions interessants. Concretament, vam trobar vies i funcions enriquides relacionades amb el desenvolupament neuronal i la direccionalitat dels axons (en el cas dels efectes de la DCP), amb el transport i l'activitat dels canals cel·lulars (en el cas dels efectes de l'àcid valproic) i amb les dendrites, la projecció neuronal i la senyalització via glutamat (en el cas dels efectes del topiramid).

Altres mecanismes epigenètics

En aquest estudi hem analitzat només un dels mecanismes epigenètics coneguts: la metilació de l'ADN. Aquest mecanisme és el que ha estat més àmpliament analitzat, probablement degut a l'extensa metodologia existent per analitzar-lo.

Per a poder fer una anàlisi exhaustiva dels mecanismes epigenètics que modulen la susceptibilitat de la migranya caldria analitzar també els altres factors epigenètics. Segurament els diferents factors epigenètics actuen de forma complementària i dependent els uns dels altres. Tot i això, és important remarcar que l'objectiu del nostre estudi era determinar gens de susceptibilitat de la migranya usant una aproximació epigenètica, no pas determinar l'efecte dels diferents mecanismes epigenètics involucrats en aquesta malaltia.

Del model a la migranya en humans: futurs estudis

Per poder determinar si els resultats obtinguts en aquest estudi estan relacionats amb la migranya en humans, un dels estudis que podria realitzar-se és un estudi d'associació genètica de tipus cas - control dels gens trobats amb regions diferencialment metilades. Així es podria determinar si existeixen diferències a nivell genètic que permeten lligar aquests gens amb la migranya en humans.

ii. Metilòmica vs transcriptòmica: comparació dels resultats de metilació de l'ADN amb l'anàlisi de l'expressió gènica

Paral·lelament a la realització de l'anàlisi de la metilació de l'ADN, es va realitzar una anàlisi de l'expressió gènica de les mateixes mostres. Aquest estudi es va dur a terme en col·laboració amb el Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona. Els resultats obtinguts en l'anàlisi de l'expressió gènica formen part d'un altre treball de tesi, per tant, no els inclouem en aquesta discussió. Tot i això sí que discutirem els resultats obtinguts en la comparació entre l'anàlisi de la metilació de l'ADN i l'anàlisi de l'expressió gènica.

Contràriament al que esperàvem en un inici, no vam trobar coincidències entre ambdós estudis. La manca de coincidències ens va portar a la conclusió que ambdues anàlisis estaven analitzant situacions diferents. L'anàlisi de la metilació de l'ADN reflexa l'efecte provocat pel tractament; en canvi, l'anàlisi de l'expressió gènica reflexa l'efecte de la DCP. Això es deu a que l'efecte sobre la metilació de l'ADN es dona a més llarg termini en comparació amb l'efecte sobre l'expressió gènica. Així, en el cas de la metilació de l'ADN es poden començar a veure canvis induïts per l'acció de les DCPs, però majoritàriament els canvis trobats es deuen a l'efecte del tractament. En el cas de l'expressió gènica els canvis que s'observen es deuen a l'efecte de les DCPs, el qual emmascara els canvis induïts pel tractament.

La manca de correlació entre ambdós estudis segurament també es deu al fet que existeixen varis mecanismes que regulen l'expressió gènica, no només la metilació de l'ADN. Probablement, els canvis d'expressió gènica induïts en aquest model estan regulats per un efecte global dels diferents mecanismes epigenètics existents.

E. GENÈTICA I EPIGENÈTICA DE LA MIGRANYA

Els resultats presentats en aquesta tesi en el camp de la migranya reflecteixen, d'una banda, la complexitat genètica que està darrera d'aquesta malaltia i, d'altra banda, realitzen una primera aproximació relacionant l'epigenètica amb la migranya.

A principis d'aquest segle es va completar la seqüenciació del genoma humà (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). En aquell moment semblava que s'havia obtingut tota la informació per tal d'entendre la complexitat del genoma humà. Els estudis desenvolupats durant els anys següents han demostrat que aquesta afirmació no és del tot correcta. Aquest fet queda reflectit en la ingent quantitat d'informació derivada del projecte ENCODE, l'objectiu del qual és la identificació dels elements funcionals de la seqüència del genoma humà (Birney et al., 2007).

Tornant a la migranya, els estudis genètics que s'han realitzat en els darrers anys han cercat variants genètiques associades a la malaltia. El següent pas seria analitzar els factors epigenètics que estan implicats en la migranya i realitzar una correlació entre els resultats obtinguts mitjançant ambdues aproximacions. La integració dels resultats genètics i epigenètics permetria la comprensió de les conseqüències de les diferències genètiques descrites en la migranya.

F. PERSPECTIVES DE FUTUR EN L'ESTUDI GENÈTIC DE LA MIGRANYA

El grup de recerca on he realitzat aquesta tesi té una llarga trajectòria en l'estudi de la base genètica de la migranya. L'entrada del grup dins el *International Headache Genetics Consortium* ha permès la participació del grup en projectes que involucren l'anàlisi de milers de mostres mitjançant diferents aproximacions metodològiques. Fet que no hagués estat possible sense la col·laboració entre diferents grups de recerca de diferents països.

Aquest consorci té en marxa diferents projectes encarats a desvetllar la base genètica de la migranya. D'una banda, s'estan augmentant el nombre de pacients amb migranya

amb i sense aura que són genotipats per tal de realitzar estudis de GWAS. També s'està realitzant una anàlisi genòmica de variants codificants rares en migranya amb aura. Paral·lelament, s'està realitzant la seqüenciació exòmica tant de pacients amb migranya amb aura com de pacients amb migranya hemiplègica. A més a més, s'està duent a terme un estudi de metilació de l'ADN en pacients amb migranya crònica.

A part dels estudis genètics i epigenètics, fora d'aquest consorci també s'estan realitzant nombrosos estudis basats en l'ús de models animals i en tècniques de neuroimatge en pacients per intentar dilucidar els mecanismes involucrats en la fisiopatologia de la migranya i també per tal d'identificar nous biomarcadors de la malaltia.

Esperem, doncs, que en els propers anys els esforços conjunts realitzats en diferents grups de recerca repartits en laboratoris de tot el món, permetin obtenir resultats útils per tal d'ampliar el coneixement de la migranya i així poder alleugerir el dolor permanent i insuportable patit per milers i milers de pacients arreu.

CONCLUSIONS

1. Els resultats dels diferents cribratges mutacionals indiquen l'existència d'una gran variabilitat en relació a l'expressió fenotípica de les mutacions trobades en un mateix gen, fins i tot d'aquelles que impliquen el mateix canvi nucleotídic.
2. El cribratge mutacional de trastorns neurològics paroxístics pediàtrics, com el torticolí paroxístic benigne del lactant, l'hemiplegia alternant de la infància, la discinèsia paroxística cinesigènica i la síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1, remarca la importància de l'estudi genètic d'aquests trastorns, n'amplia l'espectre de mutacions descrites i destaca la probable heterogeneïtat genètica en tots ells. En el cas del torticolí paroxístic benigne del lactant es confirma que es tracta d'una de les formes més precoces de canalopatia neuronal.
3. L'estudi genètic de casos familiars i esporàdics amb migranya hemiplègica ha suposat una contribució significativa a l'epidemiologia en casos espanyols, confirmant un predomini de les mutacions en el gen *CACNA1A* també en aquesta població, ha permès augmentar l'espectre de mutacions descrites, les quals han estat analitzades a nivell funcional, i ha augmentat el nombre de casos descrits sense mutacions en el gens associats a migranya hemiplègica, remarcant la importància de realitzar estudis enfocats a descobrir nous gens causants d'aquesta malaltia.
4. La combinació de l'anàlisi de lligament a escala genòmica i la seqüenciació de l'exoma complet en una família amb migranya hemiplègica no ha resultat suficient per tal de trobar la variant causant; remarcant la necessitat d'analitzar més d'un individu per tal de tenir èxit en utilitzar aquestes metodologies.
5. L'estudi d'associació genètica a nivell genòmic (GWAS) realitzat en cohorts grans de pacients i controls ha permès identificar gens que podrien estar relacionats amb la susceptibilitat a desenvolupar la migranya comuna.
6. L'anàlisi de la metilació de l'ADN a nivell genòmic en un model en rata de depressió cortical propagada (DCP) indica que la DCP, l'àcid valproïc i el topiramàt indueixen canvis en la metilació de l'ADN en gens que podrien estar involucrats en la modulació de la susceptibilitat a patir migranya.
7. La caracterització dels gens amb regions diferencialment metilades, obtinguts en el model en rata de DCP, ha permès identificar gens relacionats amb el desenvolupament neuronal i la direccionalitat dels axons (en el cas dels efectes de la DCP), amb el transport i l'activitat dels canals cel·lulars (en el cas dels efectes de l'àcid valproïc) i amb les dendrites, la projecció neuronal i la senyalització via glutamat (en el cas dels efectes del topiramàt); ampliant el nombre de gens que podrien estar involucrats en la susceptibilitat a patir migranya.

APÈNDIX 1

CARACTERITZACIÓ DELS GENS MÉS RELLEVANTS CITATS EN AQUESTA TESI

En aquest apèndix es realitza una caracterització dels gens més rellevants citats en aquesta tesi. En primer lloc trobem la taula 20 amb un resum de les característiques més importants de cadascun dels gens. Finalment, es desenvolupa una caracterització més extensa d'aquests.

Gen	Locus citogenètic	Locus molecular	Proteïna codificada	Funció proteica	Malalties associades
<i>CACNA1A</i>	19p13	19: 13,206,441 - 13,506,459	Subunitat α_1 del canal de calci neuronal	Control de l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic	MH, TPBL, HAI, EA2, SCA6
<i>SCN1A</i>	2q24.3	2: 165,989,159 - 166,149,131	Subunitat α del canal neuronal de Na^+	Involucrat en la iniciació i la propagació dels potencials d'acció	MH, Ep
<i>ATP1A2</i>	1q23.2	1:160,115,729 - 160,143,590	Subunitat α_2 de la bomba astrocítica Na^+/K^+	Promou la recaptació de glutamat de l'espai sinàptic	MH, HAI
<i>ATP1A3</i>	19q13.31	19: 41,966,475 - 41,994,275	Subunitat α_3 de la bomba Na^+/K^+	Involucrat en la recaptació de neurotransmissors	HAI, DYT12
<i>PRRT2</i>	16p11.2	16: 29,812,087 - 29,815,880	Proteïna transmembranarica en prolines	Desconeguda. Interacciona amb SNAP25	DCP, MH, BFIS, ICCA
<i>SLC2A1</i>	1p34.2	1: 42,925,374 - 42,959,175	Transportador de glucosa tipus 1	Transport de glucosa a l'interior cel·lular	GLUT1DS
<i>KCNK18</i>	10q25.3	10: 117,197,488 - 117,210,298	Canal de K^+ de tipus K2P (TRESK)	Involucrat en l'excitabilitat neuronal	MA
<i>CSNK1D</i>	17q25	17: 82,239,668 - 82,273,717	Isoforma δ de la proteïna casein kinasa	Involucrada en la regulació del ritme circadià	MA + SAFS

Taula 20. Característiques més rellevants dels gens descrits en aquesta tesi. *La informació compresa en aquesta taula ha estat extreta de la web: <http://ghr.nlm.nih.gov/>. MH: migranya hemiplègica; TPBL: torticoli paroxístic benigne del lactant; HAI: hemiplegia alternant de la infància; EA2: atàxia episòdica tipus 2; SCA6: atàxia espinocerebel·lar de tipus 6; Ep: epilèpsia; DYT12: parkinsonisme-distonia d'origen precoç; DPC: discinèsia paroxística cinesigènica; BFIS: crisis epilèptiques benignes de l'infant; ICCA: convulsions infantils i coreoatetosi; GLUT1DS: síndrome de la deficiència del transportador de glucosa GLUT1; SAFS: síndrome de l'avenç de la fase del son.*

CACNA1A

El gen *CACNA1A* codifica la subunitat α_1 del canal de calci neuronal regulat per voltatge (Cav2.1) que està involucrat en l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic. Els canals Cav2.1 es localitzen en les terminacions presinàptiques i en les membranes somatodendrítiques de moltes regions cerebrals, incloent totes les estructures cerebrals que han estat relacionades amb la patogènesi de la migranya, com són el còrtex cerebral, el gangli del trigemin i el tronc encefàlic. Els canals Cav2.1 tenen un paper molt important en el control de l'alliberament de neurotransmissors, sobretot en les sinapsis excitatòries (Pietrobon, 2005).

SCN1A

El gen *SCN1A* codifica per la subunitat α del canal neuronal de Na^+ activat per voltatge (Nav1.1) i s'expressa sobretot en la membrana plasmàtica de les interneurons inhibidores, jugant un paper indispensable en la iniciació i la propagació dels potencials d'acció.

ATP1A2

El gen *ATP1A2* codifica la subunitat α_2 de la bomba ATPasa Na^+/K^+ , la qual es troba principalment en astròcits promovent la recaptació de glutamat de l'espai sinàptic. Les mutacions en el gen *ATP1A2* provocarien una menor recaptació dels ions K^+ i del glutamat de l'espai sinàptic provocant una recuperació més lenta de l'excitació neuronal.

ATP1A3

El gen *ATP1A3* codifica la subunitat α_3 de la bomba Na^+/K^+ , la qual s'expressa sobretot en neurones i s'encarrega d'establir i mantenir els gradients electroquímics d'ambdós ions a través de la membrana plasmàtica (Lingrel et al., 2007).

El gen *ATP1A3* codifica la subunitat α_3 de la bomba ATPasa Na^+/K^+ i el gen *ATP1A2* codifica la subunitat α_2 de la mateixa bomba. Aquests enzims s'encarreguen d'establir i mantenir els gradients electroquímics dels ions Na^+ i K^+ a través de la membrana plasmàtica, els quals són essencials per a l'osmoregulació, el transport dependent de Na^+ d'una gran

varietat de molècules i l'excitabilitat nerviosa i muscular (Vos et al., 2013). Estudis *in vitro* que comparen les isoformes que s'expressen a cervell, concretament les α_1 , α_2 i α_3 , indiquen que les isoformes α_1 i α_3 s'expressen en neurones, per tant tenen un paper important en la neurotransmissió, i que la isoforma α_2 s'expressa en astròcits, mantenint els nivells apropiats de K^+ a l'espai extracel·lular (Lingrel et al., 2007). Les diferències existents entre les dues isoformes neuronals es basen en que la α_3 té una afinitat menor pel Na^+ i major per l'ATP, en comparació amb la α_1 . Aquestes diferències suggereixen que les neurones utilitzen la isoforma α_1 per mantenir els gradients iònics basals i que durant una activitat d'alta freqüència, quan la concentració intracel·lular de Na^+ augmenta i els nivells d'ATP disminueixen, la isoforma α_3 s'activa (Kim et al., 2007).

PRRT2

El gen *PRRT2* codifica per una proteïna transmembranal que conté una regió rica en prolines a l'extrem N-terminal. La seva funció és encara desconeguda, tot i que s'ha comprovat que s'expressa a cervell i que interacciona amb la proteïna sinàptica SNAP25 (Lee et al., 2012).

La proteïna PRRT2 s'expressa en moltes regions del sistema nerviós central, particularment al còrtex, al cerebel i a l'hipocamp. Degut a la seva interacció amb SNAP25, la qual forma part del complex proteic SNARE i és important per la regulació de l'exocitosi de les vesícules presinàptiques, s'ha suggerit que PRRT2 té un paper en el cicle de les vesícules sinàptiques (Lee et al., 2012). Un mal funcionament en la proteïna PRRT2 podria comportar una reducció en l'alliberament de neurotransmissors, la qual podria causar l'aparició de crisis epilèptiques, entre d'altres.

SLC2A1

El gen *SLC2A1* codifica pel transportador de glucosa tipus 1 (GLUT1). Aquesta proteïna es localitza a la membrana plasmàtica i s'encarrega del transport de la glucosa per tal que la cèl·lula pugui utilitzar-la com a font d'energia. En cervell, la proteïna GLUT1 s'encarrega de transportar la glucosa a través de la membrana hematoencefàlica i, un cop dins del cervell, de transportar-la entre les cèl·lules de la glia.

KCNK18

El gen *KCNK18* codifica la proteïna TRESK, un canal de K⁺ de tipus K2P que s'expressa als ganglis espinals i a les neurones del gangli trigemin i té un paper important en l'excitabilitat neuronal. Aquest canal s'encarrega de rectificar les concentracions de K⁺ retornant els potencials de membrana cap a l'estat de repòs.

CSNK1D

El gen *CSNK1D* codifica per la isoforma δ de la proteïna casein kinasa. Aquesta proteïna és una serina-treonina kinasa que fosforila la proteïna del rellotge circadiari Per2 i també altres proteïnes involucrades en la senyalització cerebral [Knippschild et al., 2005].

APÈNDIX 2

CERCA DE FACTORS GENÈTICS INVOLUCRATS EN LA CRONIFICACIÓ DE LA MIGRANYA MITJANÇANT UN ESTUDI D'ASSOCIACIÓ GENÈTICA

RESUM

La migranya crònica (MC) és un dels fenotips més extrems dins l'expectre clínic de la migranya. Tot i això, la seva base genètica és desconeguda. L'objectiu d'aquest estudi es va basar en determinar si existeixen factors genètics involucrats en la cronificació de la migranya.

Inicialment es van seleccionar 144 polimorfismes (SNPs) localitzats en 48 gens candidats els quals van ser analitzats per determinar si estaven associats a la cronificació de la migranya en dues etapes. La primera etapa va constar de 262 pacients amb MC i la segona etapa va constar de 226 pacients amb migranya amb elevada freqüència (MEF). Finalment, es va realitzar una darrera fase de replicació en la que es van analitzar aquells SNPs amb p-valors < 0,05 en 531 pacients amb MC o MEF.

Es van trobar 8 SNPs significativament associats a MC i MEF en la primera i la segona etapa, però cap dels 8 va replicar-se en la darrera fase.

Aquest és el primer estudi d'associació genètica en el qual s'analitza la cronificació de la migranya. La manca de resultats positius podria revertir-se en estudis futurs on s'utilitzessin cohorts més nombroses de pacients, on s'analitzessin SNPs a nivell genòmic o bé on s'utilitzessin diferents aproximacions genètiques.

REFERÈNCIA

Louter MA, Fernandez-Morales J, de Vries B, Winsvold B, Anttila V, Fernandez-Cadenas I, Vila-Pueyo M, Sintas C, van Duijn CM, Cormand B, Álvarez-Sabin J, Montaner J, Ferrari MD, van den Maagdenberg AMJM, Palotie A, Zwart JA, Macaya A, Terwindt GM, Pozo-Rosich P. (2014) Candidate gene association study searching for genetic factors involved in migraine chronification. Cephalalgia (Epub ahead of print)



Candidate-gene association study searching for genetic factors involved in migraine chronification

Cephalalgia

0(0) 1–8

© International Headache Society 2014

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0333102414547141

cep.sagepub.com



MA Louter^{1,2}, J Fernandez-Morales³, B de Vries⁴,
B Winsvold^{5,6,7,8}, V Anttila^{9,10,11}, I Fernandez-Cadenas^{12,13},
M Vila-Pueyo¹⁴, C Sintas^{15,16}, CM van Duijn¹⁷,
B Cormand^{15,16,18}, J Álvarez-Sabin¹⁹, J Montaner^{13,19},
MD Ferrari¹, AMJM van den Maagdenberg^{1,4}, A Palotie^{5,9,10,11},
JA Zwart^{6,7,8}, A Macaya¹⁴, GM Terwindt¹ and P Pozo-Rosich^{3,19}

Abstract

Introduction: Chronic migraine (CM) is at the severe end of the clinical migraine spectrum, but its genetic background is unknown. Our study searched for evidence that genetic factors are involved in the chronification process.

Methods: We initially selected 144 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) from 48 candidate genes, which we tested for association in two stages: The first stage encompassed 262 CM patients, the second investigated 226 patients with high-frequency migraine (HFM). Subsequently, SNPs with p values < 0.05 were forwarded to the replication stage containing 531 patients with CM or HFM.

Results: Eight SNPs were significantly associated with CM and HFM in the two-stage phase. None survived replication in the third stage.

Discussion: We present the first comprehensive genetic association study for migraine chronification. There were no significant findings. Future studies may benefit from larger, genome-wide data sets or should use other genetic approaches to identify genetic factors involved in migraine chronification.

Keywords

Chronic migraine, high-frequency migraine, genetics, association studies

Date received: 12 December 2013; revised: 1 April 2014; 7 July 2014; accepted: 20 July 2014

¹Department of Neurology, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

²Department of Psychiatry, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

³Headache and Neurological Pain Research Group, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

⁴Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

⁵Department of Human Genetics, Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, United Kingdom

⁶FORMI, Oslo University Hospital, Norway

⁷Department of Neurology, Oslo University Hospital, Norway

⁸Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Norway

⁹Analytical and Translational Genetics Unit, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, USA

¹⁰Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard, USA

¹¹Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Finland

¹²Stroke Genetics and Pharmacogenetics, Fundació per la Docència i Recerca Mutua Terrassa, Spain

¹³Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research, Universidad Autònoma de Barcelona, Spain

¹⁴Pediatric Neurology Research Group, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

¹⁵Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

¹⁶Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Spain

¹⁷Department of Epidemiology, Erasmus University Medical Center, the Netherlands

¹⁸Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Spain

¹⁹Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Spain

M.A.L. and J.F.-M. contributed equally to this work. G.M.T. and P.P.-R. are shared last authors.

Corresponding author:

Patricia Pozo-Rosich, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Pg. Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain. Email: ppozo@vhebron.net

Introduction

According to the International Classification of Headache Disorders, third edition beta (ICHD-III beta) classification criteria, a clinical diagnosis of chronic migraine (CM) is made when a patient has 15 or more days with headache per month of which at least eight days have features of migraine headache (or that are described by the patient as migraine and are relieved by migraine-specific medication) (1). CM is at the severe end of the clinical migraine spectrum with a substantially decreased quality of life and increased disability, and is strongly associated with depression, medication overuse, and/or cutaneous allodynia (2,3). The reported prevalence of CM is estimated to be around 0.5% to 2.0% (4,5). Recently, several genome-wide association studies (GWAS) have identified a dozen susceptibility gene variants and loci for episodic migraine (6–8), but until now no studies have focused on identifying genetic risk factors for CM.

It is debatable whether it is meaningful to make a strict distinction between episodic migraine and CM because headache frequency in patients varies from month to month and the thresholds of 15 headache days and eight migraine days, while practical, are arbitrary (9). Genetic studies in rarer complex disease subtypes, such as CM, are particularly challenging as collecting sufficiently large numbers of well-characterized patients is difficult. Therefore, we decided to also include a group of patients with high-frequency migraine (HFM) who suffer from headache 10 to 14 days per month, with half or more days meeting the criteria for migraine.

The aim of this study was to obtain evidence for association of variants in genes, acting in pathways possibly implicated in the chronification process of migraine as well as relevant secondary hits from GWAS, with chronification of migraine. In total, 144 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) selected based on literature and previous studies were tested in a three-stage design.

Methods

Participants and design of the genetic association study

Participants included in our study were patients diagnosed with either CM or HFM, and healthy control individuals. Migraine diagnoses were based on ICHD criteria. A three-stage genetic association study was performed (Figure 1). The discovery stage included 262 CM patients and 2879 control individuals (all patients came from the CHROMIG study (Spain), or the Leiden University Migraine Neuro Analysis

(LUMINA) study (the Netherlands)). In this stage, all 144 SNPs (in 48 genes) were tested. The selected markers fulfilled one or more of the following criteria: i) SNPs had been positively associated with migraine and not replicated in other migraine candidate-gene association studies; ii) the corresponding genes had already been implicated in mechanisms relevant to the chronification of migraine; or iii) SNPs were identified as secondary findings in previous migraine GWAS. In the second stage, all SNPs of the first stage that showed a p value < 0.05 were tested in a further 226 patients diagnosed with HFM vs. the same 2879 controls (patients again came from Spain or the Netherlands). In the third stage, SNPs with p values < 0.05 in the first two stages were tested for replication in 531 patients with CM or HFM (all patients came from the CHROMIG study (Spain), the LUMINA study (the Netherlands), or the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) (Norway)). In this stage, 2491 different control individuals from the three countries were tested.

Gene and SNP selection

We designed a candidate-gene association study focusing on genes that are likely associated with migraine or migraine comorbidities and may act as risk factors for migraine progression. To date, many association studies have been performed to identify genetic factors that confer susceptibility to common migraine (10,11). We selected genetic variants that had been studied in Caucasian populations, especially those that were studied only once. According to these criteria, a total number of 42 SNPs in 26 genes were selected. These genes were related to: i) ion metabolism transport (calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit (*CACNB2*) and potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2 (*KCNB2*) (12), syntaxin 1A (*STX1A*) (13), endothelin 1 (*EDN1*), endothelin receptor type A (*EDNRA*) and endothelin receptor type B (*EDNRB*) (14–16); ii) dopamine (*DBH*) (17) and serotonin metabolism (*HTR2B*) (18); iii) hormonal metabolism (*ESR1*) (19–23); iv) vascular disease (interleukin (*IL*)-9, potassium channel, subfamily K, member 17 (*KCNK17*), low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (*LRP1*), matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (*MMP12*), methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)+ dependent) 1, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase (*MTHFD1*), nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (*NOS3*), sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit (*SCNN1A*), transforming growth factor, beta 1 (*TGFBI*) and tumor necrosis factor (*TNF*) (24–26); v) autonomous nervous system dysfunction (GNAS complex locus (*GNAS1*)

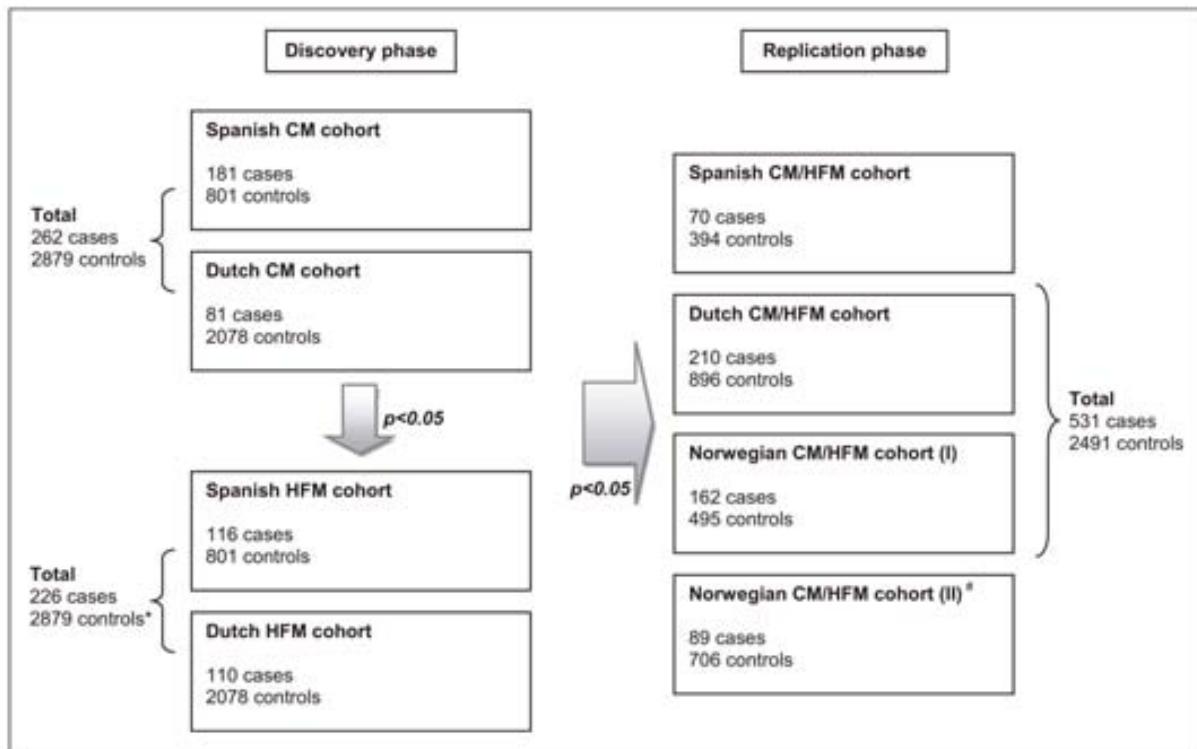


Figure 1. Three-stage gene association cohort study design.

CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; GWAS: genome-wide association study.

*In stages 1 and 2, the same group of 2879 controls was used. [#]The second Norwegian cohort was previously genotyped as part of a GWAS (5). This cohort was used for in silico replication in the present study. The other cohorts in stage 3 were genotyped using a TaqMan genotyping assay.

and potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 (*KCNJ11*) (27,28); vi) stress-response (brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*)) (29); vii) and psychiatric disorder-related genes, specially associated with anxiety and depression syndrome (catechol-O-methyltransferase (*COMT*), cryptochrome circadian clock 1 (*CRY1*), vasoactive intestinal peptide receptor 2 (*VIPR2*), regulator of G-protein signaling 2 (*RGS2*), sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit (*SCN9A*) and Wolfram syndrome 1 (wolframin) (*WFS1*)) (30–33). In addition, we selected candidate genes that encode molecules known to play an important role in migraine pathophysiology but that had not been studied before in candidate-gene association studies for migraine. In more detail, 37 TagSNPs were selected from CEU Hapmap data using a tagger pairwise tool with $r^2 > 0.8$ (Haploview tool) that codes for calcitonin-gene related peptide (*CALCA*) and its CGRP-receptor subunits (calcitonin receptor-like (*CALCRL*) and receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1 (*RAMP1*)). The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (*PACAP*), a neuroexcitatory peptide released to periaqueductal gray matter during neurogenic inflammation, encoded by the

adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) (*ADCYAP1*) gene, and its receptor, encoded by adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type 1 (*ADCYAP1R1*), were also investigated with 17 tagSNPs. *ESR1* and *ESR2*, but not G protein-coupled estrogen receptor 1 (*GPR30*) estrogen receptors, have been previously studied in relation to migraine, so we included *GPR30*, which encodes a multi-pass membrane protein that binds estrogen. Fractalkine, a chemokine that has been associated with neuroprotection (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (*CX3CL1*) gene), and its receptor (*CX3CR1*) were chosen as candidate genes with six tagSNPs (34). We also focused on two molecules that had been previously reported in a microarray study as probable migraine with aura biomarkers, namely alpha-phodrin (*SPTAN1*) and hippocalcin-like protein (*HPCAL1*) (35). The former is a cytoskeletal protein of the spectrins family and the latter is a member of the neuron-specific calcium-binding protein family and is involved in neuronal signaling in the central nervous system. Two tagSNPs in both genes were genotyped. A tagSNP in peripherin (*PRPH*), a cytoskeletal protein localized in neurons of the peripheral nervous system, the expression of which has been

associated with *GPR30*, was also studied (36). Finally, eight tagSNPs in a gene involved in circadian rhythm and metabolism regulation (*CLOCK*) were added to the panel. Overall, 77 non-previously studied gene variants in 12 genes were selected.

Finally, 25 polymorphisms extracted from the list of secondary top hits in the analysis of the first migraine GWAS (6) that was carried out by our International Headache Genetics Consortium (IHGC) were included. The list included 15 intergenic SNPs and 10 variations that were located in gene-coding regions (acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (*ACSL5*), chromosome 4 open reading frame 22 (*C4orf22*), DCC netrin 1 receptor (*DCC*), insulin-induced gene 2 (*INSIG2*), opioid binding protein/cell adhesion molecule-like (*OPCML*), olfactory receptor, family 9, subfamily Q, member 1 (*OR9Q1*), reelin (*RELN*), SET and MYND domain containing 3 (*SMYD3*), STAM binding protein-like 1 (*STAMBPL1*) and transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8 (*TRPM8*)). In summary, 119 SNPs were genotyped in 38 candidate genes, as well as 25 additional SNPs from GWAS data.

Cohorts

Spanish CM and HFM patients were recruited at the Headache Unit of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona). Patients with CM were diagnosed by a clinical interview and physical examination by a headache-specializing neurologist, according to the ICHD-III beta classification (1). HFM was diagnosed when patients suffered from headache 10 to 14 days per month, of which half or more days fulfilled the criteria for migraine. Healthy controls were blood donors. Exclusion criteria for this control population were migraine, a positive family history for migraine and any type of severe or recurrent headache in first-degree relatives.

Dutch CM and HFM patients were available from the well-defined, web-based LUMINA population (Leiden University Migraine Neuro Analysis program) (www.lumc.nl/hoofdpijn). Details of this study are described elsewhere (37). Migraine was diagnosed according to the ICHD-III beta criteria (1). CM was diagnosed when patients suffered from migraine and indicated that they experienced severe headache 15 or more days per month. HFM was diagnosed when patients suffered from migraine and indicated that they experienced severe headache 10–14 days per month. Control samples for the discovery phase were part of the population-based Rotterdam Study (38). Control samples for the replication phase were collected via a Dutch blood bank.

The Norwegian patients were recruited from the population-based HUNT-2 (1995–1997) and HUNT-3 (2006–2008) studies, in which all inhabitants (age ≥ 20 years) of the Nord-Trøndelag county of Norway were invited to participate (39,40). Migraine was diagnosed based on a modified version of the most recent ICHD criteria at the time of each study, and this questionnaire-based headache classification has been validated by interview diagnoses (39,40). Migraineurs reporting headache seven or more days per month were classified as HFM, and those reporting headache 15 or more days per month were classified as CM. Controls were recruited from the same two studies, and participants fulfilling criteria for migraine were excluded from the control population.

Genotyping

Spanish cohorts. Venous blood samples of individuals who fulfilled inclusion criteria were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and conserved at -80°C until DNA extraction. DNA was extracted from blood lymphocytes at the Centre de Regulació Genòmica (CRG, Barcelona, Spain) with the Chemagen[®] extraction kit (Perkin Elmer, Germany) and at the Departament de Genètica (Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) by a standard salting-out procedure (41). Quantity and quality of DNA samples were controlled spectrophotometrically with NanoDrop ND1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Genotyping of SNPs in the discovery sample set was performed with VeraCode[®] GoldenGate[®] technology (Illumina, CRG, Barcelona, Spain). For the replication phase, an additional 70 CM and HFM patients and 394 controls were recruited under the same criteria and procedures that were used for the discovery sample. Blood sampling and DNA extraction were performed in the same way. Genotyping was performed with a TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the 7900HT Sequence Detection System (SDS, Applied Biosystems) in 384-well plates and following the manufacturer's protocol.

Dutch cohorts. Peripheral blood samples were collected in EDTA tubes. Subsequently, DNA was isolated using a standard salting-out method. Genotyping of the samples had been previously performed as part of two GWAS for common migraine (6,7). Genotyping of the replication cohort was performed with a TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A standard polymerase chain reaction (PCR) was carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix. Genotyping clusters were analyzed using the LightCycler LC-480

machine and LightCycler[®] 480 1.5.0 software, version 1.5.0.39 (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) in 384-well plates following the manufacturer's protocol.

Norwegian cohorts. DNA from all Norwegian samples was extracted from blood using two kits: Autopure Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany) and Masterpure Kit (Medinor, Oslo, Norway), both based on a salting-out procedure. Quantity and quality of DNA samples were controlled regularly by monitoring every eighth sample spectrophotometrically with NanoDrop ND1000 and ND8000 (NanoDrop). Genotyping of the replication cohort was performed with a TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). A standard PCR reaction was carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix. Genotyping clusters were analyzed using the LightCycler LC-480 machine and LightCycler[®] 480 1.5.0 software, version 1.5.0.39 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) in 384-well plates following the manufacturer's protocol. A part of the Norwegian sample for replication had previously been genotyped with the Illumina 670 k platform, as part of a GWAS of migraine (8), and was used for in silico replication for the current study. We used the Illuminus calling algorithm, with the following filters for genotyped SNPs: minimum call rate per SNP and per individual (0.97), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) p value higher than 1.00×10^{-6} and minor allele frequency (MAF) >0.01 . For those SNPs that were not directly genotyped, imputation was performed with Impute v.2.1.2 in a standardized pipeline, using HapMap2 data from a CEU population as the reference panel.

Statistical analyses

We performed power calculations for all three steps of our design, assuming an additive model, an effect allele frequency of 0.20 and effect sizes ranging from 1.2 to 1.4. We added the outcome of these power calculations to the online Supplementary Material. Statistical analyses were performed using PLINK v1.07 (42) and SNPTEST v2.2.0 (43). GTOOL v0.7.5 was used to combine different cohorts. First, the entire panel of SNPs was tested for the HWE for each cohort considering $p < 0.05$ as the threshold. Then, both allele and genotype frequencies were compared between cases and controls, considering additive, genotypic (co-dominance), dominant and recessive models. Subsequently, a meta-analysis was performed using GWAMA v2.1. For all analyses, the threshold for statistical significance was defined as a p value below 0.05. Approval was obtained from local medical ethics committees and written informed consent was obtained from all participants.

Results

For this study, 144 SNPs in genes already implicated in migraine or that had surfaced as interesting secondary hits in GWAS (see online Supplementary Material) were used in a three-stage association design (Figure 2). In the first stage, SNPs were tested in 262 patients with CM vs. 2,879 control individuals. Nominal significant associations (p value <0.05) were obtained for 30 SNPs (see also online Supplemental Material, Table 2). These 30 SNPs were taken forward to the second stage with 226 patients with HFM and the same control data set, where eight SNPs showed a nominally significant association; rs5742912 (in *SCNN1A*), rs3792603 (in *CLOCK*), rs2956 (in *CALCA*), rs858745 (in *CALCRL*), rs302680 (in *RAMPI*), rs2267730 and rs2299908 (in *ADCYAP1R1*), and rs217693, which is an intergenic SNP (see Table 1 for detailed information on these 8 SNPs). These eight SNPs were taken forward to the replication stage and were genotyped in three replication cohorts from Spain (70 patients with CM or HFM and 394 controls), the Netherlands (210 patients with CM or HFM and 896 controls), and Norway (162 patients with CM or HFM and 495 controls). The availability of GWA data allowed testing of seven of the eight SNPs in 89 additional Norwegian patients with CM or HFM and 706 controls.

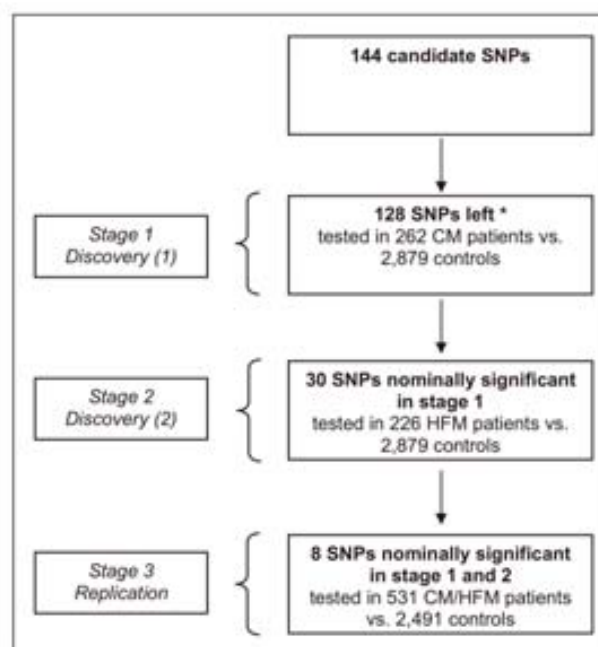


Figure 2. SNP selection study flow.

SNP: single-nucleotide polymorphism; CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium. *16 SNPs excluded due to genotyping failure, low HWE, or low rate of successful genotypes. Nominally significant: $p < 0.05$.

Subsequently, a combined meta-analysis of the association results from these replication cohorts with 531 patients with CM or HFM and 2491 controls was performed but showed no statistically significant associations.

Discussion

Here we present the first comprehensive genetic association study in CM and HFM migraineurs testing 144 SNPs from 48 genes in 1019 patients with CM or HFM, without significant associations. Patient numbers in each cohort were relatively small, largely because of the rarity of CM, which makes it difficult to collect large enough patient samples. As CM is a complex genetic disorder, it is likely that multiple genetic variants, each with relatively small effect, contribute to disease susceptibility, suggesting that large numbers of patients and controls are needed to reach sufficient power to detect a genetic association. We attempted to address this challenge in two ways. First, to increase overall numbers, we decided to include not only CM patients, but also HFM individuals, as we consider the cutoff values for a diagnosis of CM to be rather arbitrary and instead favor the idea that migraine chronification has a broader spectrum with respect to the number of headache days (9). Second, by selecting only candidate genes (and SNPs therein) we reduced the massive correction for multiple testing that is needed for unbiased GWA approaches. Considering the negative results, our approach may still have had insufficient statistical power or we may have selected SNPs irrelevant to migraine

chronification. As even large international collaborations, such as the IHGC, have difficulties collecting large enough cohorts of well-characterized patients with CM and HFM, we feel that studies like ours will probably remain underpowered in the immediate future. We are working with the IHGC on unifying the criteria to select patients so that future studies will be able to count on larger and better phenotyped cohorts.

CM is severely disabling and difficult to manage, as affected patients experience substantially more-frequent headaches, comorbid pain and affective disorders, and fewer pain-free intervals, than do those with episodic migraine (4). Furthermore, the relationship of CM with cutaneous allodynia has been investigated, indicating that cutaneous allodynia is a clear risk factor for migraine chronification (3). Different models have been proposed to explain this relationship. Further investigations into the basic mechanisms of cutaneous allodynia, and its relationship with migraine chronification, could lead to new potential genes that should be studied in future designs.

Clinical and genetic studies have shown that migraine is a multifactorial disorder with complex interaction between multiple predisposing genetic and modulating non-genetic factors. GWAS have identified 13 gene variants pointing, among others, at pathways involved in glutamatergic neurotransmission and synaptic function (8). Translating results from GWAS to pathophysiological mechanisms, however, remains one of the biggest challenges in molecular biology as gene effect sizes are small and their interactions are complex.

Table 1. Results of the replication phase (stage 3).

General SNP information					Stage 1	Stage 2	Stage 3				
SNP	Chr. (position)	Gene	Ref. allele	Alt. allele	Discovery phase (CM)	Discovery phase (HFM)	Replication phase (CM/HFM)				
					p value	p value	p value	OR (95% CI)	Cohorts (N)	Samples (N)	Effects
rs5742912	12 (6458350)	SCN11A	G	A	0.035	0.003	0.31	0.872 (0.672–1.132)	3	2108	-?/-
rs3792603	4 (56302058)	CLOCK	G	A	0.006	0.004	0.69	1.024 (0.911–1.151)	4	2943	-+/-+/-
rs217693	14 (62402801)	Intergenic	G	A	0.045	0.019	0.10	0.911 (0.816–1.018)	4	2930	-+/-
rs2956	11 (14989121)	CALCA	T	A	<0.001	0.029	0.90	0.993 (0.895–1.102)	4	2967	-+/-+/-
rs858745	2 (188216807)	CALCRL	T	C	<0.001	0.004	0.12	1.129 (0.971–1.313)	4	2925	+/-+/-+/-
rs302680	2 (238791396)	RAMP1	G	A	0.040	0.010	0.89	1.009 (0.887–1.147)	4	2937	+/-+/-+/-
rs2267730	7 (31122630)	ADCYAP1R1	T	C	0.043	0.036	0.36	0.956 (0.868–1.052)	4	2845	-+/-+/-
rs2299908	7 (31138096)	ADCYAP1R1	G	A	0.026	0.046	0.34	0.946 (0.843–1.061)	4	2871	-+/-+/-

SNP: single-nucleotide polymorphism; CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; Ref. allele: Reference allele; Alt. allele: alternative allele; OR: odds ratio; CI: confidence interval. Genomic position in basepairs according to Build 37. Stage 1 included 262 CM cases and 2879 controls, stage 2 included 226 HFM cases and 2879 controls (same controls as stage 1), and stage 3 included 531 CM/HFM cases and 2491 controls. Effects: Direction of individual effects in the four replication cohorts, depicted in the following order: Spanish CHROMIG (TaqMan)/Norwegian Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) (in silico)/Norwegian HUNT (TaqMan)/Dutch Leiden University Migraine Neuro Analysis (LUMINA) (TaqMan). (+) risk addition; (-) risk reduction; (?) not calculated (because of missing data).

We suggest that for future designs it is relevant to consider the outcome of withdrawal from medication, as the vast majority of CM patients are (over)using acute headache medication. In this study, we did not have sufficient data to include this aspect in the analysis. However, future studies would benefit from subdividing CM individuals into patients responsive to withdrawal therapy and returning to episodic migraine after withdrawal of their medication, and

patients in whom such withdrawal has no or less effect on attack frequency. Lastly, although the problem of statistical power will remain problematic in association studies for CM and HFM, we would like to put forward that perhaps other genetic approaches are more fruitful in detecting genes and pathways involved in CM, such as gene-expression studies, epigenetic studies or the analysis of rare variants.

Clinical implications

- No genetic variants were detected, indicating that genetic testing to identify patients at increased risk for migraine chronification is not warranted so far.
- Medication overuse and the success of reverting to episodic migraine after withdrawal of acute medication in individual patients should be considered when studying chronic migraine.
- Future studies may benefit from larger data sets or should use other genetic approaches to identify genetic factors involved in migraine chronification.

Funding

This work was supported by grants from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) (VICI 918.56.602 to M.D.F., VIDI 917.11.319 to G.M.T.); the European Community (EC); and the Centre for Medical Systems Biology (CMSB) in the framework of the Netherlands Genomics Initiative (NGI), the Orion Farnos Research Foundation (to V.A.), the South-Eastern Norway Regional Health Authority (2010075 and 2011083 to B.W. and J.A.Z.) and the Miguel Servet Programme (CP12/03298 to I.F.-C.). This project has also been funded by public donation mediated by the Fundació La Marató TV3 (072310), Fondo de Investigaciones Sanitarias: FIS (PI10/00876), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2009-13182-C01, SAF2009-13182-C03) and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2009SGR0971). None of the funders had any role in the design or conduct of the study.

Conflict of interest

M.A. Louter reports support for conference visits from Menarini and Allergan. M.D. Ferrari reports grants and consultancy or industry support from Medtronic, Menarini, and Merck and independent support from NWO, ZonMW, the United States National Institutes of Health (NIH), the European Community, and the Dutch Heart Foundation. G.M. Terwindt reports grants and consultancy/industry support from Menarini, and independent support from NWO. P. Pozo-Rosich reports support for conference visits from MSD and Almirall and consultancy for Allergan. The other authors have nothing to declare.

Acknowledgments

The Nord-Trøndelag Health Study (the HUNT Study) is a collaboration between HUNT Research Centre (Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and

Technology, NTNU), Nord-Trøndelag County Council, Central Norway Health Authority, and the Norwegian Institute of Public Health.

References

1. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33: 629–808.
2. Bigal ME and Lipton RB. Modifiable risk factors for migraine progression. *Headache* 2006; 46: 1334–1343.
3. Louter MA, Bosker JE, van Oosterhout WP, et al. Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain* 2013; 136 (Pt 11): 3489–3496.
4. Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, et al. Chronic migraine—classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol* 2011; 8: 162–171.
5. Katsarava Z, Manack A, Yoon MS, et al. Chronic migraine: Classification and comparisons. *Cephalalgia* 2011; 31: 520–529.
6. Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 2010; 42: 869–873.
7. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 2012; 44: 777–782.
8. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 2013; 45: 912–917.
9. Lipton RB, Penzien DB, Turner DP, et al. Methodological issues in studying rates and predictors of migraine progression and remission. *Headache* 2013; 53: 930–934.
10. de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, et al. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 2009; 126: 115–132.
11. Eising E, de Vries B, Ferrari MD, et al. Pearls and pitfalls in genetic studies of migraine. *Cephalalgia* 2013; 33: 614–625.

12. Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, et al. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3318–3331.
13. Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, et al. Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: A case-control association study in the Spanish population. *Neurosci Lett* 2009; 455: 105–109.
14. MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: The Stroke Prevention in Young Women study. *Stroke* 2009; 40: e550–e557.
15. Tikka-Kleemola P, Kaunisto MA, Hamalainen E, et al. Genetic association study of endothelin-1 and its receptors *EDNRA* and *EDNRB* in migraine with aura. *Cephalalgia* 2009; 29: 1224–1231.
16. Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, et al. Association between migraine and endothelin type A receptor (*ETA* – 231 A/G) gene polymorphism. *Neurology* 2001; 56: 1273–1277.
17. Fernandez F, Colson N, Quinlan S, et al. Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics* 2009; 10: 199–208.
18. Corominas R, Sobrido MJ, Ribasés M, et al. Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B: 177–184.
19. Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, et al. The estrogen receptor 1 *G594A* polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. *Neurogenetics* 2004; 5: 129–133.
20. Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, et al. Testing of variants of the *MTHFR* and *ESR1* genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia* 2006; 26: 1462–1472.
21. Oterino A, Pascual J, Ruiz de Alegria C, et al. Association of migraine and *ESR1 G325C* polymorphism. *Neuroreport* 2006; 17: 61–64.
22. Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, et al. Lack of association of hormone receptor polymorphisms with migraine. *Eur J Neurol* 2009; 16: 413–415.
23. Joshi G, Pradhan S and Mittal B. Role of the oestrogen receptor (*ESR1 PvuII* and *ESR1 325 C->G*) and progesterone receptor (*PROGINS*) polymorphisms in genetic susceptibility to migraine in a North Indian population. *Cephalalgia* 2010; 30: 311–320.
24. Schurks M. Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *J Headache Pain* 2012; 13: 1–9.
25. Rainero I, Grimaldi LM, Salani G, et al. Association between the tumor necrosis factor-alpha –308 G/A gene polymorphism and migraine. *Neurology* 2004; 62: 141–143.
26. Mazaheri S, Hajilooi M and Rafiei A. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with migraine without aura. *J Neurol* 2006; 253: 1589–1593.
27. Oterino A, Ruiz-Alegria C, Castillo J, et al. *GNAS1 T393C* polymorphism is associated with migraine. *Cephalalgia* 2007; 27: 429–434.
28. Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, et al. Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population. *Hypertension* 2008; 51: 1658–1664.
29. Yoshida K, Higuchi H, Kamata M, et al. The *G196A* polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and the antidepressant effect of milnacipran and fluvoxamine. *J Psychopharmacol* 2007; 21: 650–656.
30. Krugel LK, Biele G, Mohr PN, et al. Genetic variation in dopaminergic neuromodulation influences the ability to rapidly and flexibly adapt decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17951–17956.
31. Soria V, Martinez-Amorós E, Escaramis G, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: *CRY1* and *NPAS2* are associated with unipolar major depression and *CLOCK* and *VIP* with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1279–1289.
32. Smoller JW, Paulus MP, Fagerness JA, et al. Influence of *RGS2* on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65: 298–308.
33. Di Lorenzo C, Sances G, Di Lorenzo G, et al. The wolframin *His611Arg* polymorphism influences medication overuse headache. *Neurosci Lett* 2007; 424: 179–184.
34. Combadiere C, Godin O, Vidal C, et al. Common *CX3CR1* alleles are associated with a reduced risk of headaches. *Headache* 2008; 48: 1061–1066.
35. Nagata E, Hattori H, Kato M, et al. Identification of biomarkers associated with migraine with aura. *Neurosci Res* 2009; 64: 104–110.
36. Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, et al. Role of the oestrogen receptors *GPR30* and *ERalpha* in peripheral sensitization: Relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalalgia* 2009; 29: 729–741.
37. van Oosterhout WP, Weller CM, Stam AH, et al. Validation of the web-based LUMINA questionnaire for recruiting large cohorts of migraineurs. *Cephalalgia* 2011; 31: 1359–1367.
38. Hofman A, van Duijn CM, Franco OH, et al. The Rotterdam Study: 2012 objectives and design update. *Eur J Epidemiol* 2011; 26: 657–686.
39. Hagen K, Zwart JA, Aamodt AH, et al. The validity of questionnaire-based diagnoses: The third Nord-Trøndelag Health Study 2006–2008. *J Headache Pain* 2010; 11: 67–73.
40. Hagen K, Zwart JA, Vatten L, et al. Head-HUNT: Validity and reliability of a headache questionnaire in a large population-based study in Norway. *Cephalalgia* 2000; 20: 244–251.
41. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
42. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575.
43. Marchini J, Howie B, Myers S, et al. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007; 39: 906–913.

APÈNDIX 3

Les mutacions en el gen SZT2 causen encefalopatia infantil amb epilèpsia i dismòrfia del cos callós

RESUM

Les encefalopaties epilèptiques són malalties severes genèticament heterogènies en les quals l'activitat epilèptica contribueix al deteriorament neuronal. Es van estudiar dos nens no emparentats amb encefalopatia epilèptica d'origen primerenc caracteritzats per la presència d'epilèpsia refractària i retràs en el desenvolupament, com també per un cos callós gruixut i curt.

Mitjançant la seqüenciació de l'exoma, es van identificar mutacions en el gen *SZT2* en ambdós pacients. Les mutacions causants inclouen una mutació sense sentit en homozigosi i una mutació sense sentit en heterozigositat composta amb una mutació que afecta un lloc de *splicing* exònic. La darrera mutació comporta que un dels exons no sigui transcrit i que es crei un nou codó STOP prematur, tal i com indiquen els resultats de la RT-PCR en ARN extret de la sang del pacient. S'ha predit que les 3 mutacions trobades resultin en la resposta de degradació del ARN missatger i/o en el truncament prematur de la proteïna que implicaria una pèrdua de la funció d'aquesta. Tot i que el paper de la proteïna *SZT2* en l'excitabilitat neuronal i en el desenvolupament neuronal encara no està descrit, la proteïna *Szt2* s'havist que modula el llindar de les crisis epilèptiques en ratolí, resultats consistents amb la nostra troballa en humans.

Els resultats d'aquest estudi permeten concloure que les mutacions en el gen *SZT2* causen un tipus sever d'encefalopatia infantil de tipus autosòmic recessiu amb crisis intractables i anomalies neuroradiològiques distintives.

REFERÈNCIA

Lina Basel-Vanagaite, Tova Hershkovitz, Eli Heyman, Miquel Raspall-Chaure, Naseebullah Kakar, Pola Smirin-Yosef, Marta Vila-Pueyo, Liora Korenreich, Holger Thiele, Harald Bode, Irena Lagovsky, Dvir Dahary, Ami Haviv, Metsada Pasmanik-Chor, Peter Nürnberg, Doron Gothelf, Christian Kubisch, Mordechai Shohat, Alfons Macaya, Guntram Borck. (2013) Biallelic *SZT2* mutations cause infantile encephalopathy with epilepsy and dysmorphic corpus callosum. *Am J Hum Genet* 93:524-529.

Biallelic *SZT2* Mutations Cause Infantile Encephalopathy with Epilepsy and Dysmorphic Corpus Callosum

Lina Basel-Vanagaite,^{1,2,3,4,*} Tova Hershkovitz,⁵ Eli Heyman,⁶ Miquel Raspall-Chaure,⁷ Naseebullah Kakar,⁸ Pola Smirin-Yosef,² Marta Vila-Pueyo,⁷ Liora Kornreich,⁹ Holger Thiele,¹⁰ Harald Bode,¹¹ Irina Lagovsky,³ Dvir Dahary,¹² Ami Haviv,¹² Monika Weisz Hubshman,⁴ Metsada Pasmanik-Chor,¹³ Peter Nürnberg,^{10,14,15} Doron Gothelf,^{2,16} Christian Kubisch,⁸ Mordechai Shohat,^{1,2,3,4} Alfons Macaya,⁷ and Guntram Borck^{8,*}

Epileptic encephalopathies are genetically heterogeneous severe disorders in which epileptic activity contributes to neurological deterioration. We studied two unrelated children presenting with a distinctive early-onset epileptic encephalopathy characterized by refractory epilepsy and absent developmental milestones, as well as thick and short corpus callosum and persistent cavum septum pellucidum on brain MRI. Using whole-exome sequencing, we identified biallelic mutations in seizure threshold 2 (*SZT2*) in both affected children. The causative mutations include a homozygous nonsense mutation and a nonsense mutation together with an exonic splice-site mutation in a compound-heterozygous state. The latter mutation leads to exon skipping and premature termination of translation, as shown by RT-PCR in blood RNA of the affected boy. Thus, all three mutations are predicted to result in nonsense-mediated mRNA decay and/or premature protein truncation and thereby loss of *SZT2* function. Although the molecular role of the peroxisomal protein *SZT2* in neuronal excitability and brain development remains to be defined, *Szt2* has been shown to influence seizure threshold and epileptogenesis in mice, consistent with our findings in humans. We conclude that mutations in *SZT2* cause a severe type of autosomal-recessive infantile encephalopathy with intractable seizures and distinct neuroradiological anomalies.

Children presenting with neonatal or infantile encephalopathies featuring epilepsy often follow a devastating course leading to premature death or to a poor neurological outcome. The developing brain seems to be particularly prone and susceptible to seizure activity. The impairment of active processes of myelination, synaptogenesis, neuron migration, and apoptosis occurring in the neonatal and infantile periods have been implicated in both the initiation and the propagation of seizures, as well as in the often devastating results of seizure activity.^{1,2} The motor, sensory, and cognitive development of a child with epilepsy is often impaired by ongoing epileptic activity.³ Thus, in those conditions featuring frequent seizures and/or prominent epileptiform abnormalities on electroencephalography (EEG), epilepsy itself might contribute to cognitive impairment, and these disorders are classified as epileptic encephalopathies.

Early-onset epileptic encephalopathies (EOEEs) are highly heterogeneous, and when the most common acquired, malformative, and metabolic etiologies are ruled out, the possibility of a genetic cause must be addressed. Specific

syndromes are defined on the basis of seizure type, age of onset, and the results of ancillary tests, and this has proved useful for guiding genetic studies.^{4,5} However, the genetic origins and underlying molecular processes of EOEEs have been described in only a few well-defined syndromes,^{5,6} such as Ohtahara syndrome (MIM 308350 and 612164). Ohtahara syndrome, one of the most severe and earliest forms of epilepsy, is characterized by a suppression burst pattern on EEG and can be caused by heterozygous *de novo* mutations in *STXBP1* (MIM 602926).^{7,8} Mutations in more than ten additional genes cause early infantile epileptic encephalopathy in a broad sense,⁶ but because of the lack of specific clinical, electrophysiologic, and neuroradiologic signs, many affected children have no specific diagnosis. Contemporary tools for genetic analysis, such as microarray-based comparative genomic hybridization (array CGH) and whole-exome sequencing, have greatly enhanced the ability to identify pathogenic copy-number variations and mutations even in rare disease phenotypes.^{9,10} Understanding the genetic basis of EOEEs will enable more precise diagnosis, genetic

¹Raphael Recanati Genetic Institute, Rabin Medical Center, Beilinson Campus, Petah Tikva 49100, Israel; ²Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel; ³Felsenstein Medical Research Center, Rabin Medical Center, Petah Tikva 49100, Israel; ⁴Pediatric Genetics Unit, Schneider Children's Medical Center of Israel, Petah Tikva 49202, Israel; ⁵Department of Pediatrics B, Rambam Health Care Campus, Haifa 31096, Israel; ⁶Department of Pediatric Neurology, Assaf Harofeh Medical Center, Zerifin 70300, Israel; ⁷Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Vall d'Hebron Research Institute, Autonomous University of Barcelona, 08035 Barcelona, Spain; ⁸Institute of Human Genetics, University of Ulm, 89081 Ulm, Germany; ⁹Imaging Department, Schneider Children's Medical Center of Israel, Petah Tikva 49202, Israel; ¹⁰Cologne Center for Genomics, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany; ¹¹Division of Pediatric Neurology, Children's Hospital, University of Ulm, 89075 Ulm, Germany; ¹²Toldot Genetics Ltd., Hod Hasharon 45217, Israel; ¹³Bioinformatics Unit, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel; ¹⁴Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne, 50931 Cologne, Germany; ¹⁵Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases, University of Cologne, 50674 Cologne, Germany; ¹⁶Child Psychiatry Unit, The Edmond and Lily Safra Children's Hospital, Sheba Medical Center, Tel Hashomer 52620, Israel

*Correspondence: basel@post.tau.ac.il (L.B.-V.), guntram.borck@uni-ulm.de (G.B.)

http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.005. ©2013 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

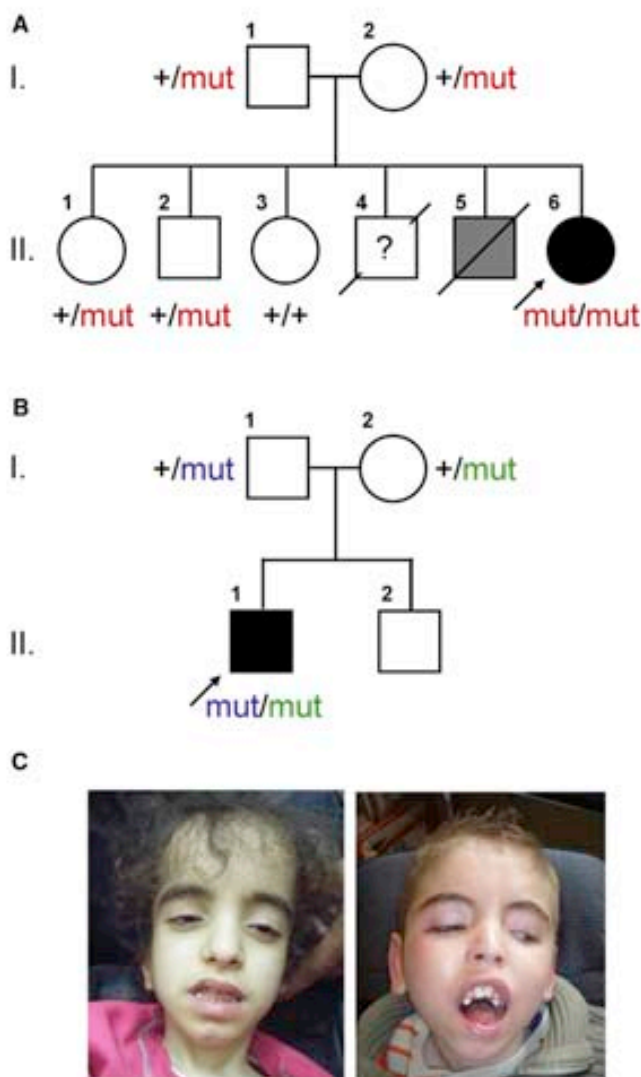


Figure 1. Pedigrees and Pictures of Individuals with EOEE
 (A and B) Pedigrees of family 1 (A) and family 2 (B). Individuals affected or likely affected by EOEE are represented by filled black and gray symbols, respectively. The index individuals are depicted by arrows. The plus sign (+) denotes the reference sequence, and "mut" indicates the respective mutation. Red "mut" represents the c.73C>T (p.Arg25*) nonsense mutation, blue "mut" represents the c.1496G>T exonic splice-site mutation, and green "mut" represents the c.2092C>T (p.Gln698*) nonsense mutation.
 (C) Individual 1 at the age of 10 years (left) and individual 2 at the age of 9 years (right). Common facial dysmorphic features include a high forehead, downslanting palpebral fissures, ptosis, and arched and laterally extended eyebrows.

counseling, and classification of these diseases and might eventually assist in the development of targeted treatments.

We aimed at the identification of causative alleles in genetically unresolved forms of EOEE. The study was approved by the ethics committee of the University of Ulm and the Helsinki committee of the Rabin Medical Center in accordance with a protocol approved by the National Committee for Genetic Studies, Israeli Ministry of Health. Written informed consent to participate in

the study was obtained from the affected individuals' parents.

We studied two unrelated individuals with unexplained EOEE and remarkable clinical and radiological similarities. Clinical features are summarized in Table S1, available online. Individual 1 (II:6, Figure 1A), a 10-year-old girl, is the sixth child of healthy nonconsanguineous parents who are both of Iraqi Jewish descent. One of her brothers (individual II:5) was probably affected by the same condition; he died at age 3 years from respiratory infection, and no DNA was available for genetic studies. Individual 2 (II:1, Figure 1B), a 9-year-old boy, is the first child of healthy nonconsanguineous Spanish parents. Both unrelated children had common facial dysmorphic features (Figure 1C), severe developmental delay with hypotonia in infancy, decreased tendon reflexes, and absence of developmental milestones; there was no microcephaly. Seizures began at the age of 4 years in individual 1 and at the age of 2 months in her affected brother and in individual 2. Seizures in individual 1 were characterized by loss of consciousness, drooling, and perioral cyanosis and were at times followed by tonic-clonic generalization. Initially described as focal, seizures in individual 2 affected either side of the body with frequent tonic generalization. The current seizure pattern includes multiple tonic seizures per day and atypical absences. Seizures have proved highly refractory to multiple antiepileptic drug combinations in both children. EEG of individual 1 was normal prior to epilepsy onset. After the onset of epilepsy, EEG showed an abnormal background trace and prominent epileptiform abnormalities in both children (Figure S1), but no suppression burst pattern. In individual 1, EEG at the age of 4 years showed slowed 4–5 Hz background activity with isolated spike waves and sharp waves in the right frontopolar and right frontocentral areas, as well as focal 12–14 and 6 Hz epileptic activity with secondary generalization, corresponding to clinical seizures. In individual 2, EEG at the age of 8 years revealed altered background activity and no topographic differentiation and multifocal spikes in either hemisphere. Brain MRI showed a short and thick corpus callosum and persistent cavum septum pellucidum in both children, as well as in the deceased brother of individual 1 (Figure 2). Electromyography, nerve conduction velocities, array CGH, and metabolic investigations in blood, urine, and cerebrospinal fluid all gave normal results.

To identify the underlying genetic cause of the putatively autosomal-recessive encephalopathy, we sequenced the exomes of unrelated individuals 1 and 2. For the exome sequence analysis, we used the SeqCap EZ Human Exome Library v.2.0 and v.3.0 enrichment kits in individuals 1 and 2, respectively, and an Illumina HiSeq2000 sequencer with a paired-end 100 bp protocol. Sequence reads were aligned to the human reference genome (hg19 assembly, UCSC Genome Browser). Mean coverage was 84× and 111× for the exome of individuals 1 and 2, respectively, and approximately 95% of the target sequences were covered at least 10× in both exomes. Data analysis was

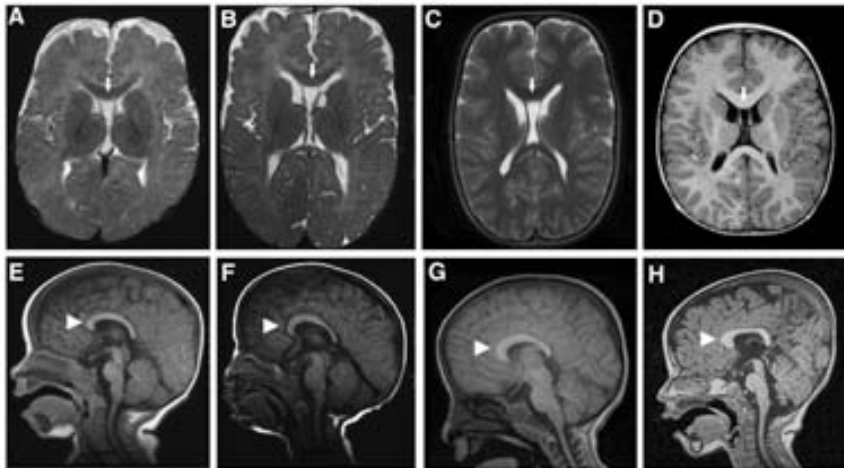


Figure 2. Brain MRI Findings

Persistent cavum septum pellucidum (arrows) and thick and short corpus callosum (arrowheads) in the three affected children.

(A and E) Individual II-5 at the age of 6 months.

(B, C, F and G) Individual II-6 (individual 1) at the ages of 7 months (B and F) and 4 years and 8 months (C and G).

(D and H) Individual 2 at the age of 2 years.

performed with a combination of available tools and custom scripts (details are available on request) and, in the case of individual 2, with the recently established VARBANK exome pipeline from the Cologne Center for Genomics (H.T. and P.N., unpublished data). We focused on private and rare (minor allele frequency < 0.01) presumptively damaging variants.

Neither of the two exomes displayed an apparent pathogenic allele in any of the 15 OMIM-referenced genes mutated in early infantile epileptic encephalopathy. Because the parents of individual 1 are both of Iraqi Jewish origin, we assumed that a disease-causing mutation would be present in the homozygous state. In individual 1, SNP-array-based genotyping with an Affymetrix Human Mapping 50K Xba 240 array and HomozygosityMapper¹¹ identified five homozygosity regions > 2 Mb (on chromosomes 1, 3, 4, 10, and 12; Table S2); collectively, they span 20 Mb and contain >200 genes, none of which is known to be implicated in EOEEs. Four genes mapping to these regions of homozygosity contained a rare homozygous variant (Tables S3 and S4). Only one of these genes, *SZT2*, also harbored two distinct rare variants in individual 2, consistent with compound-heterozygous mutations. *SZT2* was the only gene in which rare or unique biallelic damaging mutations were observed in the exomes of both affected individuals.

We confirmed the three *SZT2* (RefSeq accession number NM_015284.3) mutations by Sanger sequencing on an ABI3730 DNA Analyzer after PCR amplification of the exons of interest. Individual 1 was homozygous for a c.73C>T transition in exon 2. This mutation leads to a premature stop codon (p.Arg25*) (Figure 3A) and is predicted to result in a truncation of *SZT2* after 24 of 3,375 amino acids and/or in nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Alternatively, Met50, the next downstream in-frame methionine, might be used as a translation initiation codon, leading to an N-terminally-shortened protein. The c.73C>T nonsense mutation cosegregated with the disease in the family (Figure 1A) and was absent from 143 Iraqi Jewish control subjects. Individual 2 was com-

ound heterozygous for a c.2092C>T (p.Gln698*) nonsense mutation inherited from the mother and a paternally inherited c.1496G>T mutation (Figures 1B and 3B) that was predicted to lead to the amino acid substitution p.Ser499Ile. The latter mutation affects the guanine at the last position of exon 10 (Figure 3B) and is predicted by the NNSPLICE and VARBANK-MaxEntScan splice prediction tools to significantly weaken the exon 10 splice donor site (NNSPLICE: splice score 0.88 for wild-type versus 0.11 for the mutation; VARBANK-MaxEntScan: splice score 7.7 for wild-type versus 1.36 for the mutation). For the splicing analysis, total RNA from peripheral white blood cells of individual 2 and a control was extracted from fresh EDTA blood by a standard trizol protocol. RT-PCR was performed with the QIAGEN OneStep RT-PCR kit with primers located in *SZT2* exons 9 and 11. Using direct sequencing of RT-PCR products amplified from RNA of individual 2, we observed skipping of exon 10 (Figure 3C), consistent with the bioinformatic prediction. This out-of-frame exon-skipping event is predicted to lead to a frameshift followed by a premature termination codon (p.Gly412Alafs*86). Upon RT-PCR, we detected the two mutations identified in individual 2 in a heterozygous state with largely similar intensity (Figure 3C and data not shown), suggesting that—at least in blood—these mutations induce no or incomplete NMD and are predicted to produce truncated proteins. None of the three mutations identified in the two children are present in the >6,000 European American and African American individuals included in the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Exome Sequencing Project Exome Variant Server.

We have identified mutations in *SZT2* as the cause of EOEE in two unrelated children. The disease is characterized by severe developmental delay, refractory epilepsy, and a thick corpus callosum and persistent cavum septum pellucidum. Recent advances in molecular genetics are leading to an expanding list of genes that are mutated in EOEEs.⁶ Ideally, genetic testing should be guided by the phenotype, but this is not possible for many EOEEs that do not show distinctive clinical or radiological features in addition to epilepsy and developmental delay. Thus, the causative mutation remains unknown for most children with allegedly genetic epileptic encephalopathy, which

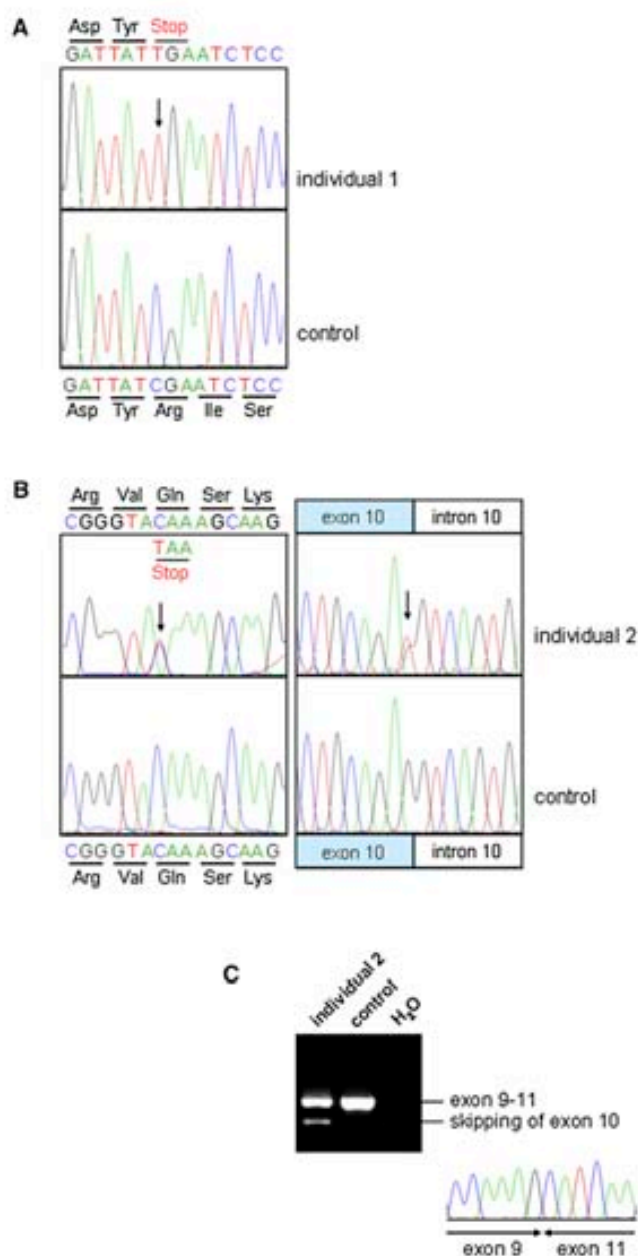


Figure 3. SZT2 Mutations

(A) Homozygous nonsense mutation c.73C>T (p.Arg25*) detected in individual 1.

(B) Compound-heterozygous mutation c.2092C>T (p.Gln698*) (left) and c.1496G>T (right) identified in individual 2.

(C) RT-PCR on total RNA extracted from the blood of individual 2 and a control shows that the c.1496G>T exonic splice-site mutation leads to the skipping of exon 10.

poses additional difficulties for discussing prognosis and genetic counseling. In contrast to the features of other genetic EOEEs, a thick corpus callosum and persistent cavum septum pellucidum appear as clues that should raise the suspicion of *SZT2* mutation.

Agensis or dysgenesis of the corpus callosum is a relatively frequent finding in neurodevelopmental disorders. It has been described in several EOEE-associated Mende-

lian syndromes, namely Aicardi syndrome (MIM 304050) and the encephalopathy associated with mutations in aristaless-related homeobox (*ARX* [MIM 300382 and 308350]).¹² Thick corpus callosum has been described in Cohen syndrome (MIM 216550), a disorder featuring microcephaly, ocular abnormalities, and cognitive impairment,¹³ and in interstitial 6q deletions.¹⁴ In most of the cases, a relatively large corpus callosum has been associated with additional structural brain abnormalities.¹⁵ Another neurodevelopmental syndrome with partial clinical overlap with the EOEE we describe is the genetically unresolved syndrome of megalencephaly, mega corpus callosum, and complete lack of motor development; this syndrome might be associated with infantile spasms and persistent cavum septum pellucidum.^{16,17}

Whether *SZT2* participates in the processes of cellular proliferation, axonal growth, or glial patterning occurring at the midline during development remains to be investigated, and thus how mutations in *SZT2* might influence callosal and/or cortical morphogenesis is unknown. However, it is conceivable that defective axonal pruning might have led to the thick corpus callosum. The finding of a persistent cavum pellucidum has been associated with epilepsy,¹⁸ but proof of causality is lacking and its frequency in the general population is presently unknown.

Use of the term *epileptic encephalopathy* presupposes that epilepsy itself contributes to encephalopathy. However, it is often difficult to weigh the role of epilepsy in newborns or infants against the pre-existing severe neurological dysfunction, given that neither seizures nor electroencephalographic abnormalities substantially modify a poor outcome that is mainly explained by the underlying etiology. The existence of severe developmental delay antedating the onset of epilepsy and EEG abnormalities in the affected girl suggests that mutations in *SZT2* also impair brain maturation and that this impairment occurs independently of the seizures.

The 71-exon gene *SZT2* (seizure threshold 2, previously known as *TIGR*, *C1orf84*, and *KIAA0467*) encodes a large protein of unknown function. It is widely expressed and has high expression in the CNS in humans and mice, predominantly in the parietal and frontal cortices, hippocampus, cerebellum, and dorsal root ganglia.^{19,20} *SZT2* contains predicted functional domains, namely a superoxide dismutase motif and a PTS1 peroxisomal targeting signal, and was shown to colocalize with catalase at the peroxisome.¹⁹ In that study, a suppression-subtractive-hybridization procedure was used for identifying upregulation of *SZT2* (called *TIGR* by the authors for "transcript increased in glutamate resistance") as protective against oxidative glutamate toxicity and H₂O₂-induced oxidative stress in a neuronal cell model. Thus, oxidative glutamate toxicity and excitotoxicity are plausible mechanisms underlying epileptogenesis caused by *SZT2* mutations.

Szt2 has been shown to influence seizure threshold and epileptogenesis in mice. *Szt2*^{mi1fk}-homozygous mouse mutants are susceptible to induced seizures, although they

do not display spontaneous seizures.²⁰ The *Szt2^{m1Frk}* allele contains a splice donor mutation after exon 32, predicting transcriptional read-through, a translational frameshift, and a premature stop. Male mutant mice treated daily with a tetanic, high-frequency electrical stimulus developed seizures significantly earlier than did wild-type controls. Most of the mice that were homozygous for another mutation, *Szt2^{Gt(XH662)By}* (a gene-trap mutation in exon 21), died before birth; surviving mutant mice had a low seizure threshold.²⁰ Thus, in mice, truncating mutations in *Szt2* can confer low seizure thresholds and embryonic lethality, phenotypes consistent with the pharmacoresistant seizures and developmental arrest in the human disease we describe. Unexpectedly, *Szt2* mRNA levels were upregulated rather than diminished in both mutant mouse models.²⁰ Although the underlying pathomechanism remains to be elucidated, the effect of the mutations at the protein level might well be loss of function, as is supposedly the case in the human disease.

Our study defines an infantile epileptic syndrome and highlights an important role for *SZT2* in epileptogenesis. Severe developmental delay antedating the onset of epilepsy suggests that *SZT2* might also play a role in human brain development. The identification of additional persons with biallelic *SZT2* mutations will shed further light on the clinical spectrum of this emerging disorder.

Supplemental Data

Supplemental Data include one figure and four tables and can be found with this article online at <http://www.cell.com/AJHG>.

Acknowledgments

We thank the families for participating in this study and M. van der Knaap for reviewing MRI images. We thank G.J. Halpern for her help with editing the manuscript. The study was supported by the Adler Chair in Pediatric Cardiology at Tel Aviv University, the Israeli Ministry of Health Chief Scientist Foundation (grant 3-4963 to L.B.-V.), the Israeli Science Foundation (grant 558/09 to L.B.-V.), the German Federal Ministry of Education and Research (NGFNplus-EMINet to P.N. and C.K.), the EuroEPINOMICS program (Deutsche Forschungsgemeinschaft [DFG] grant NU50/8-1 to P.N.), the Ministerio de Ciencia y Competitividad at Instituto de Salud Carlos III (grant PI12/01005 to A.M.), the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (grant SGR 2009/0078 to A.M.), and the DFG (to G.B.). D.D. and A.H. are the owners of Toldot Genetics Ltd.

Received: April 30, 2013

Revised: June 7, 2013

Accepted: July 1, 2013

Published: August 8, 2013

Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

Berkeley Drosophila Genome Project NNSplice 0.9, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

NHLBI Exome Sequencing Project (ESP) Exome Variant Server, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.omim.org>

RefSeq, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq>

VARBANK, <https://anubis.ccg.uni-koeln.de/varbank/>

References

- Holmes, G.L., and Ben-Ari, Y. (2001). The neurobiology and consequences of epilepsy in the developing brain. *Pediatr. Res.* 49, 320–325.
- Rho, J.M. (2004). Basic science behind the catastrophic epilepsies. *Epilepsia* 45(Suppl 5), 5–11.
- Ben-Ari, Y., and Holmes, G.L. (2006). Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurol.* 5, 1055–1063.
- Zupanc, M.L. (2009). Clinical evaluation and diagnosis of severe epilepsy syndromes of early childhood. *J. Child Neurol.* 24(Suppl), 6S–14S.
- Noh, G.J., Jane Tavyev Asher, Y., and Graham, J.M., Jr. (2012). Clinical review of genetic epileptic encephalopathies. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 281–298.
- Tavyev Asher, Y.J., and Scaglia, F. (2012). Molecular bases and clinical spectrum of early infantile epileptic encephalopathies. *Eur. J. Med. Genet.* 55, 299–306.
- Saito, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J., Uruno, K., Kumada, S., Nishiyama, K., Nishimura, A., et al. (2008). De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* 40, 782–788.
- Pavone, P., Spalice, A., Polizzi, A., Parisi, P., and Ruggieri, M. (2012). Ohtahara syndrome with emphasis on recent genetic discovery. *Brain Dev.* 34, 459–468.
- Bamshad, M.J., Ng, S.B., Bigham, A.W., Tabor, H.K., Emond, M.J., Nickerson, D.A., and Shendure, J. (2011). Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat. Rev. Genet.* 12, 745–755.
- Mefford, H.C., Yendle, S.C., Hsu, C., Cook, J., Geraghty, E., McMahon, J.M., Eeg-Olofsson, O., Sadleir, L.G., Gill, D., Ben-Zeev, B., et al. (2011). Rare copy number variants are an important cause of epileptic encephalopathies. *Ann. Neurol.* 70, 974–985.
- Seelow, D., Schuelke, M., Hildebrandt, F., and Nürnberg, P. (2009). HomozygosityMapper—an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res.* 37(Web Server issue), W593–W599.
- Paul, L.K., Brown, W.S., Adolphs, R., Tyszka, J.M., Richards, L.J., Mukherjee, P., and Sherr, E.H. (2007). Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 287–299.
- Kivittie-Kallio, S., Autti, T., Salonen, O., and Norio, R. (1998). MRI of the brain in the Cohen syndrome: a relatively large corpus callosum in patients with mental retardation and microcephaly. *Neuropediatrics* 29, 298–301.
- Rosenfeld, J.A., Amrom, D., Andermann, E., Andermann, F., Veilleux, M., Curry, C., Fisher, J., Deputy, S., Aylsworth, A.S., Powell, C.M., et al. (2012). Genotype-phenotype correlation in interstitial 6q deletions: a report of 12 new cases. *Neurogenetics* 13, 31–47.
- Lerman-Sagie, T., Ben-Sira, L., Achiron, R., Schreiber, L., Hermann, G., Lev, D., Kidron, D., and Malinger, G. (2009).

Thick fetal corpus callosum: an ominous sign? *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 34, 55–61.

16. Göhlich-Ratmann, G., Baethmann, M., Lorenz, P., Gärtner, J., Goebel, H.H., Engelbrecht, V., Christen, H.J., Lenard, H.G., and Voit, T. (1998). Megalencephaly, mega corpus callosum, and complete lack of motor development: a previously undescribed syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 79, 161–167.
17. Dagli, A.L., Stalker, H.J., and Williams, C.A. (2008). A patient with the syndrome of megalencephaly, mega corpus callosum and complete lack of motor development. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 204–207.
18. Iannetti, P., Papetti, L., Nicita, F., Castronovo, A., Ursitti, E., Parisi, P., Spalice, A., and Verrotti, A. (2011). Developmental anomalies of the medial septal area: possible implication for limbic epileptogenesis. *Childs Nerv. Syst.* 27, 765–770.
19. Toutzaris, D., Lewerenz, J., Albrecht, P., Jensen, L.T., Letz, J., Geerts, A., Golz, S., and Methner, A. (2010). A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing protein. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 811–820.
20. Frankel, W.N., Yang, Y., Mahaffey, C.L., Beyer, B.J., and O'Brien, T.P. (2009). Szt2, a novel gene for seizure threshold in mice. *Genes Brain Behav.* 8, 568–576.

BIBLIOGRAFIA

- Accioly NE, Benevides Rde D, da Costa BL, Guedes RC (2012) Ovariectomy in the developing rat decelerates cortical spreading depression in adult brain. *Int J Dev Neurosci* 30:405-410.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7:248-249.
- Akerman S, Goadsby PJ (2005) Topiramate inhibits cortical spreading depression in rat and cat: impact in migraine aura. *Neuroreport* 16:1383-1387.
- Andres-Enguix I, Shang L, Stansfeld PJ, Morahan JM, Sansom MS, Lafreniere RG, Roy B, Griffiths LR, Rouleau GA, Ebers GC, Cader ZM, Tucker SJ (2012) Functional analysis of missense variants in the TRESK (KCNK18) K channel. *Sci Rep* 2:237.
- Anttila V et al. (2008) Consistently replicating locus linked to migraine on 10q22-q23. *Am J Hum Genet* 82:1051-1063.
- Anttila V et al. (2010) Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 42:869-873.
- Anttila V et al. (2013) Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 45:912-917.
- Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA (2006) Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol* 59:652-661.
- Ayzenberg I, Katsarava Z, Sborowski A, Chernysh M, Osipova V, Tabeeva G, Yakhno N, Steiner TJ (2012) The prevalence of primary headache disorders in Russia: a countrywide survey. *Cephalalgia* 32:373-381.
- Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, Zucca C, Bersano A, Dolcetta D, Boneschi FM, Barone V, Casari G (2004) A novel mutation in the AT-P1A2 gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J Med Genet* 41:621-628.
- Bellenguez C et al. (2012) Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke. *Nat Genet* 44:328-333.

- Bennett LB, Roach ES, Bowcock AM (2000) A locus for paroxysmal kinesigenic dyskinesia maps to human chromosome 16. *Neurology* 54:125-130.
- Berkson J (1946) Limitations of the application of fourfold table analysis to hospital data. *Biometrics* 2:47-53.
- Birney E et al. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799-816.
- Bjornsson A, Gudmundsson G, Gudfinnsson E, Hrafnisdottir M, Benedikz J, Skuladottir S, Kristjansson K, Frigge ML, Kong A, Stefansson K, Gulcher JR (2003) Localization of a gene for migraine without aura to chromosome 4q21. *Am J Hum Genet* 73:986-993.
- Blau JN (1992) Migraine: theories of pathogenesis. *Lancet* 339:1202-1207.
- Bloudek LM, Stokes M, Buse DC, Wilcox TK, Lipton RB, Goadsby PJ, Varon SF, Blumenfeld AM, Katsarava Z, Pascual J, Lanteri-Minet M, Cortelli P, Martelletti P (2012) Cost of healthcare for patients with migraine in five European countries: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *J Headache Pain* 13:361-378.
- Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, Bogdanova OV, Prodanov D, Makarchuk MY, Schoenen J (2010) Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiol Dis* 41:430-435.
- Bolay H (2012) The first phase of a migraine attack resides in the cortex. *J Neural Transm* 119:569-574.
- Boydjjeva N, Varadinova M (2012) Epigenetics of psychoactive drugs. *J Pharm Pharmacol* 64:1349-1358.
- Bradley DP, Smith MI, Netsiri C, Smith JM, Bockhorst KH, Hall LD, Huang CL, Leslie RA, Parsons AA, James MF (2001) Diffusion-weighted MRI used to detect in vivo modulation of cortical spreading depression: comparison of sumatriptan and tonabersat. *Exp Neurol* 172:342-353.
- Brashear A, Ozelius LJ, Sweadner KJ (2014) ATP1A3 mutations: What is the phenotype? *Neurology*.
- Brennan KC, Bates EA, Shapiro RE, Zyuzin J, Hallows WC, Huang Y, Lee HY, Jones CR, Fu YH, Charles AC, Ptacek LJ (2013) Casein kinase idelta mutations in familial migraine and advanced sleep phase. *Sci Transl Med* 5:183ra156, 181-111.

- Buresova O, Marusyeva AM, Bures J, Fifkova E (1964) The Influence of Cortical Spreading Depression on Unit Activity in the Colliculus Inferior of the Rat. *Physiol Bohemoslov* 13:227-235.
- Buzzi MG, Tassorelli C (2010) Experimental models of migraine. *Handb Clin Neurol* 97:109-123.
- Cader ZM, Noble-Topham S, Dymont DA, Cherny SS, Brown JD, Rice GP, Ebers GC (2003) Significant linkage to migraine with aura on chromosome 11q24. *Hum Mol Genet* 12:2511-2517.
- Carlsson A, Forsgren L, Nylander PO, Hellman U, Forsman-Semb K, Holmgren G, Holmberg D, Holmberg M (2002) Identification of a susceptibility locus for migraine with and without aura on 6p12.2-p21.1. *Neurology* 59:1804-1807.
- Castiglioni C, Lopez I, Riant F, Bertini E, Terracciano A (2013) PRRT2 mutation causes paroxysmal kinesigenic dyskinesia and hemiplegic migraine in monozygotic twins. *Eur J Paediatr Neurol* 17:254-258.
- Cestele S, Scalmani P, Rusconi R, Terragni B, Franceschetti S, Mantegazza M (2008) Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1.1 (SCN1A) Na⁺ channel. *J Neurosci* 28:7273-7283.
- Charles A (2013) The evolution of a migraine attack - a review of recent evidence. *Headache* 53:413-419.
- Chasman DI et al. (2011) Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 43:695-698.
- Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, Wei W, Ni W, Tan GH, Guo SL, He J, Chen YF, Zhang QJ, Li HF, Lin Y, Murong SX, Xu J, Wang N, Wu ZY (2011) Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet* 43:1252-1255.
- Choi KH, Kim JS, Lee SY, Ryu SW, Kim SS, Lee SH, Kim S, Park HK (2012) Familial hemiplegic migraine with prolonged coma and cerebellar atrophy: CACNA1A T666M mutation in a Korean family. *J Korean Med Sci* 27:1124-1127.
- Claes L, Ceulemans B, Audenaert D, Smets K, Lofgren A, Del-Favero J, Ala-Mello S, Basel-Vanagaite L, Plecko B, Raskin S, Thiry P, Wolf NI, Van Broeckhoven C, De Jonghe P (2003) De novo SCN1A mutations are a major cause of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum Mutat* 21:615-621.
- Cloarec R et al. (2012) PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 79:2097-2103.

- Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H (2013) Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet* 132:1077-1130.
- Costa C, Tozzi A, Rainero I, Cupini LM, Calabresi P, Ayata C, Sarchielli P (2013) Cortical spreading depression as a target for anti-migraine agents. *J Headache Pain* 14:62.
- Cricchi F, Di Lorenzo C, Grieco GS, Rengo C, Cardinale A, Racaniello M, Santorelli FM, Nappi G, Pierelli F, Casali C (2007) Early-onset progressive ataxia associated with the first CACNA1A mutation identified within the I-II loop. *J Neurol Sci* 254:69-71.
- Cuenca-Leon E, Cormand B, Thomson T, Macaya A (2002) Paroxysmal kinesigenic dyskinesia and generalized seizures: clinical and genetic analysis in a Spanish pedigree. *Neuropediatrics* 33:288-293.
- 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* 28:1039-1047.
- 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* 10:191-198.
- Dahlem MA (2013) Neuromodulation: Model-Based Control Of Cortical Excitability In Early And Late Aura Phase. *Cephalalgia* 33.
- Dale RC, Gardiner A, Antony J, Houlden H (2012) Familial PRRT2 mutation with heterogeneous paroxysmal disorders including paroxysmal torticollis and hemiplegic migraine. *Dev Med Child Neurol* 54:958-960.
- De Bustos C, Ramos E, Young JM, Tran RK, Menzel U, Langford CF, Eichler EE, Hsu L, Henikoff S, Dumanski JP, Trask BJ (2009) Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1. *Epigenetics Chromatin* 2:7.
- 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⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33:192-196.
- De Giorgis V, Veggiotti P (2013) GLUT1 deficiency syndrome 2013: current state of the art. *Seizure* 22:803-811.

- De Vivo DC, Trifiletti RR, Jacobson RI, Ronen GM, Behmand RA, Harik SI (1991) Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med* 325:703-709.
- de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM (2009) Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 126:115-132.
- de Vries B, Stam AH, Beker F, van den Maagdenberg AM, Vanmolkot KR, Laan L, Ginjaar IB, Frants RR, Lauffer H, Haan J, Haas JP, Terwindt GM, Ferrari MD (2008) CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia* 28:887-891.
- de Vries B, Freilinger T, Vanmolkot KR, Koenderink JB, Stam AH, Terwindt GM, Babini E, van den Boogerd EH, van den Heuvel JJ, Frants RR, Haan J, Pusch M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Dichgans M (2007) Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. *Neurology* 69:2170-2176.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M, Strom TM (2005) Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366:371-377.
- Dong E, Chen Y, Gavin DP, Grayson DR, Guidotti A (2010) Valproate induces DNA demethylation in nuclear extracts from adult mouse brain. *Epigenetics* 5:730-735.
- dos Santos AA, Pinheiro PC, de Lima DS, Ozias MG, de Oliveira MB, Guimaraes NX, Guedes RC (2006) Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. *Exp Neurol* 200:275-282.
- Edwards SL, Beesley J, French JD, Dunning AM (2013) Beyond GWASs: illuminating the dark road from association to function. *Am J Hum Genet* 93:779-797.
- Eikermann-Haerter K, Ayata C (2010) Cortical spreading depression and migraine. *Curr Neurol Neurosci Rep* 10:167-173.
- Eikermann-Haerter K, Dilekoz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Moskowitz MA, Ayata C (2009) Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest* 119:99-109.
- Eikermann-Haerter K, Yuzawa I, Qin T, Wang Y, Baek K, Kim YR, Hoffmann U, Dilekoz E, Waeber C, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM, Moskowitz MA, Ayata C (2011) Enhanced subcortical spreading depression in familial hemiplegic migraine type 1 mutant mice. *J Neurosci* 31:5755-5763.

- Eising E, N AD, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD (2013a) Epigenetic mechanisms in migraine: a promising avenue? *BMC Med* 11:26.
- Eising E, de Vries B, Ferrari MD, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM (2013b) Pearls and pitfalls in genetic studies of migraine. *Cephalalgia* 33:614-625.
- Esserlind AL, Christensen AF, Le H, Kirchmann M, Hauge AW, Toyserkani NM, Hansen T, Grarup N, Werge T, Steinberg S, Bettella F, Stefansson H, Olesen J (2013) Replication and meta-analysis of common variants identifies a genome-wide significant locus in migraine. *Eur J Neurol* 20:765-772.
- Esteller M (2007) Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R50-59.
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M (2004) The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45:737-744.
- Freilinger T et al. (2012) Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 44:777-782.
- Friedman DI, De ver Dye T (2009) Migraine and the environment. *Headache* 49:941-952.
- Galletti F, Cupini LM, Corbelli I, Calabresi P, Sarchielli P (2009) Pathophysiological basis of migraine prophylaxis. *Prog Neurobiol* 89:176-192.
- Gardiner AR et al. (2012) PRRT2 gene mutations: from paroxysmal dyskinesia to episodic ataxia and hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2115-2121.
- Gelaye B, Peterlin BL, Lemma S, Tesfaye M, Berhane Y, Williams MA (2013) Migraine and psychiatric comorbidities among sub-saharan african adults. *Headache* 53:310-321.
- Ghosh S, Yates AJ, Fruhwald MC, Miecznikowski JC, Plass C, Smiraglia D (2010) Tissue specific DNA methylation of CpG islands in normal human adult somatic tissues distinguishes neural from non-neural tissues. *Epigenetics* 5:527-538.
- Giffin NJ, Benton S, Goadsby PJ (2002) Benign paroxysmal torticollis of infancy: four new cases and linkage to CACNA1A mutation. *Dev Med Child Neurol* 44:490-493.
- Gos M (2013) Epigenetic mechanisms of gene expression regulation in neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 73:19-37.
- Graff J, Kim D, Dobbin MM, Tsai LH (2011) Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiol Rev* 91:603-649.

- Grand W (1999) The anatomy of the brain, by Thomas Willis. *Neurosurgery* 45:1234-1236; discussion 1236-1237.
- Graves TD, Imbrici P, Kors EE, Terwindt GM, Eunson LH, Frants RR, Haan J, Ferrari MD, Goadsby PJ, Hanna MG, van den Maagdenberg AM, Kullmann DM (2008) Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. *Neurobiol Dis* 32:10-15.
- Green CD, Han JD (2011) Epigenetic regulation by nuclear receptors. *Epigenomics* 3:59-72.
- Grove ML et al. (2013) Best practices and joint calling of the HumanExome BeadChip: the CHARGE Consortium. *PLoS One* 8:e68095.
- Guedes RC, Amancio-Dos-Santos A, Manhaes-De-Castro R, Costa-Cruz RR (2002) Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Nutr Neurosci* 5:115-123.
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, Kwong KK, Cutrer FM, Rosen BR, Tootell RB, Sorensen AG, Moskowitz MA (2001) Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4687-4692.
- Harris RA et al. (2010) Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 28:1097-1105.
- Heinzen EL et al. (2012) De novo mutations in ATP1A3 cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet* 44:1030-1034.
- Hoei-Hansen CE, Dali CI, Lyngbye TJ, Duno M, Uldall P (2013) Alternating hemiplegia of childhood in Denmark: Clinical manifestations and ATP1A3 mutation status. *Eur J Paediatr Neurol*.
- Hoffmann U, Dilekoz E, Kudo C, Ayata C (2010) Gabapentin suppresses cortical spreading depression susceptibility. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1588-1592.
- Hoffmann U, Dilekoz E, Kudo C, Ayata C (2011) Oxcarbazepine does not suppress cortical spreading depression. *Cephalalgia* 31:537-542.
- Hunter RG (2012) Epigenetic effects of stress and corticosteroids in the brain. *Front Cell Neurosci* 6:18.
- Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS (2013) Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology* 38:167-182.

- ICHD (1988) Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. Headache Classification Committee of the International Headache Society. *Cephalalgia* 8 Suppl 7:1-96.
- ICHD (2004) The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1:9-160.
- ICHD (2013) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 33:629-808.
- Inbar-Feigenberg M, Choufani S, Butcher DT, Roifman M, Weksberg R (2013) Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril* 99:607-615.
- Inkster B, Strijbis EM, Vounou M, Kappos L, Radue EW, Matthews PM, Uitdehaag BM, Barkhof F, Polman CH, Montana G, Geurts JJ (2013) Histone deacetylase gene variants predict brain volume changes in multiple sclerosis. *Neurobiol Aging* 34:238-247.
- Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, Yamashita S, Kimura S, Oguni H, Morishita S, Tsuji S, Sasaki M, Hirose S (2013) Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS One* 8:e56120.
- Jakovcevski M, Akbarian S (2012) Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat Med* 18:1194-1204.
- 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.
- Jensen R, Stovner LJ (2008) Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 7:354-361.
- Johnson MP, Lea RA, Curtain RP, MacMillan JC, Griffiths LR (2003) An investigation of the 5-HT_{2C} receptor gene as a migraine candidate gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 117B:86-89.
- Jones KW, Ehm MG, Pericak-Vance MA, Haines JL, Boyd PR, Peroutka SJ (2001) Migraine with aura susceptibility locus on chromosome 19p13 is distinct from the familial hemiplegic migraine locus. *Genomics* 78:150-154.
- Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, Sen ZD, Dalkara T (2013) Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339:1092-1095.
- Kaube H, Goadsby PJ (1994) Anti-migraine compounds fail to modulate the propagation of cortical spreading depression in the cat. *Eur Neurol* 34:30-35.

- Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H, Nissila M, Sako E, Ilmavirta M, Liukkonen J, Teirmaa H, Tornwall O, Jussila M, Terwilliger J, Farkkila M, Kaprio J, Palotie A, Wessman M (2006) Testing of variants of the MTHFR and ESR1 genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia* 26:1462-1472.
- Kertesz A (1967) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. An entity within the paroxysmal choreoathetosis syndrome. Description of 10 cases, including 1 autopsied. *Neurology* 17:680-690.
- Kim JH, Sizov I, Dobretsov M, von Gersdorff H (2007) Presynaptic Ca²⁺ buffers control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the alpha3 Na(+)/K(+)-ATPase. *Nat Neurosci* 10:196-205.
- Klepper J, Diefenbach S, Kohlschutter A, Voit T (2004) Effects of the ketogenic diet in the glucose transporter 1 deficiency syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:321-327.
- Knippschild U, Gocht A, Wolff S, Huber N, Lohler J, Stoter M (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell Signal* 17:675-689.
- Ku CS, Polychronakos C, Tan EK, Naidoo N, Pawitan Y, Roukos DH, Mort M, Cooper DN (2013) A new paradigm emerges from the study of de novo mutations in the context of neurodevelopmental disease. *Mol Psychiatry* 18:141-153.
- Kubota T, Miyake K, Hirasawa T (2013) Role of epigenetics in Rett syndrome. *Epigenomics* 5:583-592.
- Kudo C, Nozari A, Moskowitz MA, Ayata C (2008) The impact of anesthetics and hyperoxia on cortical spreading depression. *Exp Neurol* 212:201-206.
- Kulis M, Queiros AC, Beekman R, Martin-Subero JI (2013) Intragenic DNA methylation in transcriptional regulation, normal differentiation and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1829:1161-1174.
- Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, Mullen Y, Pfeifer GP, Ferreri K (2009) Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One* 4:e6953.
- Labate A, Tarantino P, Viri M, Mumoli L, Gagliardi M, Romeo A, Zara F, Annesi G, Gambardella A (2012) Homozygous c.649dupC mutation in PRRT2 worsens the BFIS/PKD phenotype with mental retardation, episodic ataxia, and absences. *Epilepsia* 53:e196-199.

- Labruijere S, Stolk L, Verbiest M, de Vries R, Garrelds IM, Eilers PH, Danser AH, Uitterlinden AG, MaassenVanDenBrink A (2014) Methylation of migraine-related genes in different tissues of the rat. *PLoS One* 9:e87616.
- Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP, Marcinkiewicz MM, Ramagopalan S, Ansorge O, Brais B, Sequeiros J, Pereira-Monteiro JM, Griffiths LR, Tucker SJ, Ebers G, Rouleau GA (2010) A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 16:1157-1160.
- Laird PW (2010) Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet* 11:191-203.
- Lander ES et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Lauritzen M, Jorgensen MB, Diemer NH, Gjedde A, Hansen AJ (1982) Persistent oligemia of rat cerebral cortex in the wake of spreading depression. *Ann Neurol* 12:469-474.
- Lea RA, Ovcaric M, Sundholm J, MacMillan J, 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, Griffiths LR (2002) A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31. *Neurogenetics* 4:17-22.
- Leao (1944) Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology* 7:359-390.
- Lee H, Sininger L, Jen JC, Cha YH, Baloh RW, Nelson SF (2007) Association of progesterone receptor with migraine-associated vertigo. *Neurogenetics* 8:195-200.
- Lee HY et al. (2012) Mutations in the novel protein PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell Rep* 1:2-12.
- Leen WG et al. (2010) Glucose transporter-1 deficiency syndrome: the expanding clinical and genetic spectrum of a treatable disorder. *Brain* 133:655-670.
- Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, Pizzorusso T, Casari G (2011) Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS Genet* 7:e1002129.

- Li J, Zhu X, Wang X, Sun W, Feng B, Du T, Sun B, Niu F, Wei H, Wu X, Dong L, Li L, Cai X, Wang Y, Liu Y (2012) Targeted genomic sequencing identifies PRRT2 mutations as a cause of paroxysmal kinesigenic choreoathetosis. *J Med Genet* 49:76-78.
- Liang Y, She P, Wang X, Demarest K (2006) The messenger RNA profiles in liver, hypothalamus, white adipose tissue, and skeletal muscle of female Zucker diabetic fatty rats after topiramate treatment. *Metabolism* 55:1411-1419.
- Ligthart L et al. (2011) Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet* 19:901-907.
- Linde M, Gustavsson A, Stovner LJ, Steiner TJ, Barre J, Katsarava Z, Lainez JM, Lampl C, Lanteri-Minet M, Rastenyte D, Ruiz de la Torre E, Tassorelli C, Andree C (2012) The cost of headache disorders in Europe: the EuroLight project. *Eur J Neurol* 19:703-711.
- Lingrel JB, Williams MT, Vorhees CV, Moseley AE (2007) Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. *J Bioenerg Biomembr* 39:385-389.
- Lynngberg AC, Rasmussen BK, Jorgensen T, Jensen R (2005) Has the prevalence of migraine and tension-type headache changed over a 12-year period? A Danish population survey. *Eur J Epidemiol* 20:243-249.
- Manolio TA et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461:747-753.
- Manzoni GC, Torelli P (2008) Migraine with and without aura: a single entity? *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S40-43.
- Marini C, Conti V, Mei D, Battaglia D, Lettori D, Losito E, Bruccini G, Tortorella G, Guerrini R (2012) PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2109-2114.
- Matsushita Y, Araki K, Omotuyi OI, Mukae T, Ueda H (2013) HDAC inhibitors restore C-fibre sensitivity in experimental neuropathic pain model. *Br J Pharmacol* 170:991-998.
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, Hirschhorn JN (2008) Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet* 9:356-369.
- Meaburn E, Schulz R (2011) Next generation sequencing in epigenetics: insights and challenges. *Semin Cell Dev Biol* 23:192-199.
- Mengistu G, Alemayehu S (2013) Prevalence and burden of primary headache disorders among a local community in Addis Ababa, Ethiopia. *J Headache Pain* 14:30.

- Merikangas KR (2012) Contributions of epidemiology to our understanding of migraine. *Headache* 53:230-246.
- Miller-Delaney SF, Das S, Sano T, Jimenez-Mateos EM, Bryan K, Buckley PG, Stallings RL, Henshall DC (2012) Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *J Neurosci* 32:1577-1588.
- Milutinovic S, D'Alessio AC, Detich N, Szyf M (2007) Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. *Carcinogenesis* 28:560-571.
- Moskowitz MA (1984) The neurobiology of vascular head pain. *Ann Neurol* 16:157-168.
- Moskowitz MA, Buzzi MG (2011) Migraine general aspects. *Handb Clin Neurol* 97:253-266.
- Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, Svensson DA, Nyholt DR, Martin NG, MacGregor AJ, Cherkas LF, Boomsma DI, Palotie A (2003) Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries. *Twin Res* 6:422-431.
- Nakken S, Rodland EA, Hovig E (2010) Impact of DNA physical properties on local sequence bias of human mutation. *Hum Mutat* 31:1316-1325.
- Nielsen CS, Knudsen GP, Steingrimsdottir OA (2012) Twin studies of pain. *Clin Genet* 82:331-340.
- Nosedá R, Burstein R (2013) Migraine pathophysiology: Anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain*.
- Nyholt DR, Curtain RP, Griffiths LR (2000) Familial typical migraine: significant linkage and localization of a gene to Xq24-28. *Hum Genet* 107:18-23.
- Nyholt DR et al. (2008) A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 17:3318-3331.
- Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, Selzer RR, Richmond TA, Zhang X, Dannenberg L, Green RD, Melnick A, Hatchwell E, Bouhassira EE, Verma A, Suzuki M, Grealley JM (2009) High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res* 37:3829-3839.
- Ofofwe GE, Ofili AN (2010) Prevalence and impact of headache and migraine among secondary school students in Nigeria. *Headache* 50:1570-1575.

- Ohmori I, Ouchida M, Kobayashi K, Jitsumori Y, Mori A, Michiue H, Nishiki T, Ohtsuka Y, Matsui H (2013) CACNA1A variants may modify the epileptic phenotype of Dravet syndrome. *Neurobiol Dis* 50:209-217.
- Ohmura K, Suzuki Y, Saito Y, Wada T, Goto M, Seto S (2012) Sporadic hemiplegic migraine presenting as acute encephalopathy. *Brain Dev* 34:691-695.
- Olah G, Heredi J, Menyhart A, Czinege Z, Nagy D, Fuzik J, Kocsis K, Knapp L, Krucso E, Gellert L, Kis Z, Farkas T, Fulop F, Pardutz A, Tajti J, Vecsei L, Toldi J (2013) Unexpected effects of peripherally administered kynurenic acid on cortical spreading depression and related blood-brain barrier permeability. *Drug Des Devel Ther* 7:981-987.
- Olesen J, Larsen B, Lauritzen M (1981) Focal hyperemia followed by spreading oligemia and impaired activation of rCBF in classic migraine. *Ann Neurol* 9:344-352.
- Ookubo M, Kanai H, Aoki H, Yamada N (2013) Antidepressants and mood stabilizers effects on histone deacetylase expression in C57BL/6 mice: Brain region specific changes. *J Psychiatr Res* 47:1204-1214.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohnweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-552.
- Oswell G, Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Anttila V, Kaprio J, Farkkila M, Wessman M, Palotie A (2008) No association of migraine to the GABA-A receptor complex on chromosome 15. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B:33-36.
- Oterino A, Toriello M, Cayon A, Castillo J, Colas R, Alonson-Arranz A, Ruiz-Alegria C, Quintela E, Monton F, Ruiz-Lavilla N, Gonzalez F, Pascual J (2008) Multilocus analyses reveal involvement of the ESR1, ESR2, and FSHR genes in migraine. *Headache* 48:1438-1450.
- Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S (2011) DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *J Vis Exp*.
- Pietrobon D (2005) Function and dysfunction of synaptic calcium channels: insights from mouse models. *Curr Opin Neurobiol* 15:257-265.
- Pietrobon D, Striessnig J (2003) Neurobiology of migraine. *Nat Rev Neurosci* 4:386-398.

- Pietrobon D, Moskowitz MA (2012) Pathophysiology of migraine. *Annu Rev Physiol* 75:365-391.
- Pittman A, Hardy J (2013) Genetic analysis in neurology: the next 10 years. *JAMA Neurol* 70:696-702.
- Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28:1057-1068.
- Pringsheim T, Davenport WJ, Becker WJ (2010) Prophylaxis of migraine headache. *Cmaj* 182:E269-276.
- Purdy RA (2008) Migraine with and without aura share the same pathogenic mechanisms. *Neurol Sci* 29 Suppl 1:S44-46.
- Qureshi IA, Mehler MF (2013) Understanding neurological disease mechanisms in the era of epigenetics. *JAMA Neurol* 70:703-710.
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6107-6112.
- Read SJ, Hirst WD, Upton N, Parsons AA (2001) Cortical spreading depression produces increased cGMP levels in cortex and brain stem that is inhibited by tonabersat (SB-220453) but not sumatriptan. *Brain Res* 891:69-77.
- Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Upton N, Parsons AA (2000) SB-220453, a potential novel antimigraine agent, inhibits nitric oxide release following induction of cortical spreading depression in the anaesthetized cat. *Cephalalgia* 20:92-99.
- Reid KH, Marrannes R, Wauquier A (1988) Effects of phenytoin and flunarizine on the rise in extracellular potassium induced by repetitive stimulation of rat cerebral cortex. *Physiol Bohemoslov* 37:193-202.
- Reva B, Antipin Y, Sander C (2007) Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol* 8:R232.
- 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, Roze E, Barbance C, Meneret A, Guyant-Marechal L, Lucas C, Sabouraud P, Trebuchon A, Depienne C, Tournier-Lasserre E (2012) PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2122-2124.

- Rosewich H, Thiele H, Ohlenbusch A, Maschke U, Altmuller J, Frommolt P, Zirn B, Ebinger F, Siemes H, Nurnberg P, Brockmann K, Gartner J (2012) Heterozygous de-novo mutations in ATP1A3 in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification study. *Lancet Neurol* 11:764-773.
- Rotstein M, Doran J, Yang H, Ullner PM, Engelstad K, De Vivo DC (2009) Glut1 deficiency and alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* 73:2042-2044.
- Roubertie A, Echenne B, Leydet J, Soete S, Krams B, Rivier F, Riant F, Tournier-Lasserre E (2008) Benign paroxysmal tonic upgaze, benign paroxysmal torticollis, episodic ataxia and CACNA1A mutation in a family. *J Neurol* 255:1600-1602.
- Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G, Pinessi L (2009) Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis. *Cephalalgia* 29:818-825.
- Russell MB, Ducros A (2011) Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *Lancet Neurol* 10:457-470.
- 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* 76:327-333.
- Sances G, Guaschino E, Perucca P, Allena M, Ghiotto N, Manni R (2009) Migralepsy: a call for a revision of the definition. *Epilepsia* 50:2487-2496.
- Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WM, Kruit MC, Blom HJ, Kowa H, Frants RR, van den Maagdenberg AM, van Buchem M, Ferrari MD, Launer LJ (2006) Migraine and MTHFR C677T genotype in a population-based sample. *Ann Neurol* 59:372-375.
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarden N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A (2006) Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 34:528-542.
- Schurks M (2012) Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *J Headache Pain* 13:1-9.
- Schurks M, Rist PM, Kurth T (2010) MTHFR 677C>T and ACE D/I polymorphisms in migraine: a systematic review and meta-analysis. *Headache* 50:588-599.
- Schurks M, Zee RY, Buring JE, Kurth T (2008) Interrelationships among the MTHFR 677C>T polymorphism, migraine, and cardiovascular disease. *Neurology* 71:505-513.

- Scoggan KA, Friedman JH, Bulman DE (2006) CACNA1A mutation in a EA-2 patient responsive to acetazolamide and valproic acid. *Can J Neurol Sci* 33:68-72.
- Seidner G, Alvarez MG, Yeh JI, O'Driscoll KR, Klepper J, Stump TS, Wang D, Spinner NB, Birnbaum MJ, De Vivo DC (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat Genet* 18:188-191.
- 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.
- Serra SA, Cuenca-Leon E, Llobet A, Rubio-Moscardo F, Plata C, Carreno O, Fernandez-Castillo N, Corominas R, Valverde MA, Macaya A, Cormand B, Fernandez-Fernandez JM (2010) A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1672-1677.
- Serrano D, Manack AN, Reed ML, Buse DC, Varon SF, Lipton RB (2013) Cost and predictors of lost productive time in chronic migraine and episodic migraine: results from the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) Study. *Value Health* 16:31-38.
- Serre D, Lee BH, Ting AH (2010) MBD-isolated Genome Sequencing provides a high-throughput and comprehensive survey of DNA methylation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 38:391-399.
- Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE (2000) An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia* 41 Suppl 1:S3-9.
- Shenker N, Flanagan JM (2012) Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer* 106:248-253.
- Silberstein SD (2004) Migraine. *Lancet* 363:381-391.
- Silberstein SD (2011) Migraine preventive treatment. *Handb Clin Neurol* 97:337-354.
- Silveira-Moriyama L, Gardiner AR, Meyer E, King MD, Smith M, Rakshi K, Parker A, Mallick AA, Brown R, Vassallo G, Jardine PE, Guerreiro MM, Lees AJ, Houlden H, Kurian MA (2013) Clinical features of childhood-onset paroxysmal kinesigenic dyskinesia with PRRT2 gene mutations. *Dev Med Child Neurol* 55:327-334.

- Smith MI, Read SJ, Chan WN, Thompson M, Hunter AJ, Upton N, Parsons AA (2000) Repetitive cortical spreading depression in a gyrencephalic feline brain: inhibition by the novel benzoylamino-benzopyran SB-220453. *Cephalalgia* 20:546-553.
- Smith ZD, Gu H, Bock C, Gnirke A, Meissner A (2009) High-throughput bisulfite sequencing in mammalian genomes. *Methods* 48:226-232.
- Soragna D, Vettori A, Carraro G, Marchioni E, Vazza G, Bellini S, Tupler R, Savoldi F, Mottaciuolo ML (2003) A locus for migraine without aura maps on chromosome 14q21.2-q22.3. *Am J Hum Genet* 72:161-167.
- Stone LS, Szyf M (2013) The emerging field of pain epigenetics. *Pain* 154:1-2.
- Stovner LJ, Andree C (2010) Prevalence of headache in Europe: a review for the EuroLight project. *J Headache Pain* 11:289-299.
- Suls A, Mullen SA, Weber YG, Verhaert K, Ceulemans B, Guerrini R, Wuttke TV, Salvo-Vargas A, Deprez L, Claes LR, Jordanova A, Berkovic SF, Lerche H, De Jonghe P, Scheffer IE (2009) Early-onset absence epilepsy caused by mutations in the glucose transporter GLUT1. *Ann Neurol* 66:415-419.
- Suls A et al. (2008) Paroxysmal exercise-induced dyskinesia and epilepsy is due to mutations in SLC2A1, encoding the glucose transporter GLUT1. *Brain* 131:1831-1844.
- Summ O, Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ (2011) TRPV1 receptor blockade is ineffective in different in vivo models of migraine. *Cephalalgia* 31:172-180.
- Svensson DA, Larsson B, Bille B, Lichtenstein P (1999) Genetic and environmental influences on recurrent headaches in eight to nine-year-old twins. *Cephalalgia* 19:866-872.
- Svensson DA, Larsson B, Waldenlind E, Pedersen NL (2003) Shared rearing environment in migraine: results from twins reared apart and twins reared together. *Headache* 43:235-244.
- Swoboda KJ, Soong B, McKenna C, Brunt ER, Litt M, Bale JF, Jr., Ashizawa T, Bennett LB, Bowcock AM, Roach ES, Gerson D, Matsuura T, Heydemann PT, Nespeca MP, Jankovic J, Leppert M, Ptacek LJ (2000) Paroxysmal kinesigenic dyskinesia and infantile convulsions: clinical and linkage studies. *Neurology* 55:224-230.
- Szumilas M (2010) Explaining odds ratios. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry* 19:227-229.
- Tajerian M, Alvarado S, Millecamps M, Dashwood T, Anderson KM, Haglund L, Ouellet J, Szyf M, Stone LS (2011) DNA methylation of SPARC and chronic low back pain. *Mol Pain* 7:65.

- Takagaki M, Feuerstein D, Kumagai T, Gramer M, Yoshimine T, Graf R (2013) Isoflurane suppresses cortical spreading depolarizations compared to propofol - implications for sedation of neurocritical care patients. *Exp Neurol*.
- Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr AR, Deaton A, Andrews R, James KD, Turner DJ, Illingworth R, Bird A (2010) CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 464:1082-1086.
- Todt U, Netzer C, Toliat M, Heinze A, Goebel I, Nurnberg P, Gobel H, Freudenberg J, Kubisch C (2009) New genetic evidence for involvement of the dopamine system in migraine with aura. *Hum Genet* 125:265-279.
- Tomita H et al. (1999) Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Hum Genet* 65:1688-1697.
- Torelli P, Jensen R (2010) Headache diaries and calendars. *Handb Clin Neurol* 97:137-146.
- Tost J, Gut IG (2007) DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protoc* 2:2265-2275.
- Trachtenberg MC, Hull CD, Buchwald NA (1970) Electrophysiological concomitants of spreading depression in caudate and thalamic nuclei of the cat. *Brain Res* 20:219-231.
- Unekawa M, Tomita Y, Toriumi H, Masamoto K, Kanno I, Suzuki N (2013) Potassium-induced cortical spreading depression bilaterally suppresses the electroencephalogram but only ipsilaterally affects red blood cell velocity in intraparenchymal capillaries. *J Neurosci Res* 91:578-584.
- van Bokhoven H (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet* 45:81-104.
- 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, Frants RR, Ferrari MD (2004) A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701-710.
- van den Maagdenberg AM, Pizzorusso T, Kaja S, Terpolilli N, Shapovalova M, Hoebeek FE, Barrett CF, Gherardini L, van de Ven RC, Todorov B, Broos LA, Tottene A, Gao Z, Fodor M, De Zeeuw CI, Frants RR, Plesnila N, Plomp JJ, Pietrobon D, Ferrari MD (2010) High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in *Ca(v)2.1* S218L mice. *Ann Neurol* 67:85-98.
- Veeramah KR, Johnstone L, Karafet TM, Wolf D, Sprissler R, Salogiannis J, Barth-Maron A, Greenberg ME, Stuhlmann T, Weinert S, Jentsch TJ, Pazzi M, Restifo LL, Talwar D, Erickson RP, Hammer MF (2013) Exome sequencing reveals new causal mutations in children with epileptic encephalopathies. *Epilepsia* 54:1270-1281.

- Venter JC et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verma IM (2013) *Medicine*. Gene therapy that works. *Science* 341:853-855.
- Verret S, Steele JC (1971) Alternating hemiplegia in childhood: a report of eight patients with complicated migraine beginning in infancy. *Pediatrics* 47:675-680.
- Vikelis M, Rapoport AM (2010) Role of antiepileptic drugs as preventive agents for migraine. *CNS Drugs* 24:21-33.
- Villalon CM, Centurion D, Valdivia LF, de Vries P, Saxena PR (2003) Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol* 1:71-84.
- Vos T et al. (2013) Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2163-2196.
- 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.
- Wang JL et al. (2011) Identification of PRRT2 as the causative gene of paroxysmal kinesigenic dyskinesias. *Brain* 134:3493-3501.
- Wang Z, Xu L, Zhu X, Cui W, Sun Y, Nishijo H, Peng Y, Li R (2010) Demethylation of specific Wnt/beta-catenin pathway genes and its upregulation in rat brain induced by prenatal valproate exposure. *Anat Rec (Hoboken)* 293:1947-1953.
- Ward R, Sinnett EE (1971) Spreading cortical depression and audiogenic seizures in mice. *Exp Neurol* 31:437-443.
- Wauquier A, Ashton D, Marrannes R (1985) The effects of flunarizine in experimental models related to the pathogenesis of migraine. *Cephalalgia* 5 Suppl 2:119-123.
- Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schubeler D (2005) Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 37:853-862.
- Weber YG et al. (2008) GLUT1 mutations are a cause of paroxysmal exertion-induced dyskinesias and induce hemolytic anemia by a cation leak. *J Clin Invest* 118:2157-2168.
- Weng YL, An R, Shin J, Song H, Ming GL (2013) DNA modifications and neurological disorders. *Neurotherapeutics* 10:556-567.

- Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA (2007) Migraine: a complex genetic disorder. *Lancet Neurol* 6:521-532.
- Wessman M et al. (2002) A susceptibility locus for migraine with aura, on chromosome 4q24. *Am J Hum Genet* 70:652-662.
- WHO (2011) ATLAS of headache disorders.
- Wolff HG, Tunis MM (1952) Analysis of cranial artery pressure pulse waves in patients with vascular headache of the migraine type. *Trans Assoc Am Physicians* 65:240-244.
- Wu MC, Joubert BR, Kuan PF, Haberg SE, Nystad W, Peddada SD, London SJ (2013) A systematic assessment of normalization approaches for the Infinium 450k methylation platform. *Epigenetics* 9.
- Yabe I, Kitagawa M, Suzuki Y, Fujiwara K, Wada T, Tsubuku T, Takeichi N, Sakushima K, Soma H, Tsuji S, Niino M, Saitoh S, Sasaki H (2008) Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. *J Neurol* 255:1541-1544.
- Zhang R, Lu J, Kong X, Jin L, Luo C (2013) Targeting epigenetics in nervous system disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 12:126-141.
- Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R (2010) Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci* 30:8807-8814.
- Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M, Burstein R (2011) Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol* 69:855-865.