

ANÀLISI GENÈTICA I MOLECULAR DE LES MIGRANYES HEREDITÀRIES

memòria presentada per:
Ester Cuenca León

Per optar al grau de:
Doctora per la Universitat de Barcelona
bienni 2000-2002

Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció del **Dr. Alfons Macaya Ruiz** i el **Dr. Bru Cormand Rifà**, al Laboratori de Neurologia Infantil i Psiquiatria Genètica de la Unitat de Neurologia Infantil de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron i al Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona.

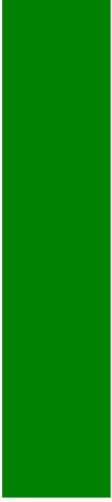
BARCELONA

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Dr. Bru Cormand Rifà

Ester Cuenca León

DISCUSSIÓ



DISCUSSIÓ

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat aprofundir en l'estudi de la base genètica de les formes monogèniques de migranya i, més específicament, identificar nous *loci* responsables del fenotip migranyós, i nous al·lels mutats en gens ja reconeguts com a responsables d'aquest trastorn genèticament heterogeni.

D'una banda, s'ha mapat el gen responsable de la migranya, de forma independent, en dues famílies catalanes extenses no emparentades, amb una herència dominant, a la regió cromosòmica 14q32. Tanmateix, la identificació del gen causant de la malaltia en aquestes famílies resta encara per resoldre.

D'altra banda, s'han identificat 9 mutacions al gen *CACNA1A*, totes elles de canvi de sentit, en individus espanyols amb diferents variants de migranya (HM, MA i CPS) i atàxia episòdica de tipus 2 (EA2). Tres de les mutacions són responsables del fenotip FHM, una de les quals es va identificar en un individu que manifestava símptomes de BPT i que va evolucionar a BPV i finalment a FHM. La quarta mutació es va trobar en un pacient que des dels 7 mesos de vida manifestava episodis d'hipotèrmia amb símptomes acompanyants i que podria correspondre a una variant, encara no ben caracteritzada clínicament, de CPS. S'han detectat dos canvis més en pacients amb manifestacions d'EA2. El setè canvi es va detectar en un pacient afectat d'EA2 i FHM, i el vuitè en un pacient amb EA2 i MA. La novena mutació s'ha identificat en dues pacients amb MA, mare i filla, que pertanyen a una família en què segrega FHM. En aquest darrer cas s'han pogut fer en col·laboració, estudis funcionals de la proteïna mutada que revelen que determinades variacions en el gen *CACNA1A* poden tenir un paper modificador i no causant, com fins ara s'havia descrit, del fenotip migranyós.

A. MIGRANYA HEMIPLÈGICA FAMILIAR I MIGRANYA AMB AURA NO HEMIPLÈGICA: LLIGAMENT GENÈTIC AL CROMOSOMA 14q32 EN DUES FAMÍLIES EXTENSES

La tasca d'identificar nous *loci* es va dur a terme en dos estudis independents en famílies grans, multigeneracionals i clínicament ben caracteritzades en què la migranya (FHM i/o MA i MO) presentava un patró d'herència aparentment autosòmic dominant, i en què per tant era probable que un únic defecte genètic determinés el fenotip migranyós. La recollida sistemàtica de famílies amb un número suficient d'individus afectats és el primer pas per afrontar una cerca a escala genòmica, amb garantia d'assolir significació estadística, mitjançant anàlisi de lligament. La caracterització clínica adequada dels pacients és també fonamental en una malaltia en què les fronteres entre "normalitat" i "patologia" no sempre són clares, i en què la descripció fenotípica depèn en bona mesura d'apreciacions subjectives fetes pel malalt. En aquest sentit, l'elaboració d'un model d'entrevista extens i rigorós és crucial per garantir l'èxit de l'estudi.

La complexitat clínica i genètica de les formes monogèniques de migranya (que encara és més acusada en les formes poligèniques) està determinada per múltiples factors, com ara l'heterogeneïtat genètica, una expressió clínica molt variable, penetració incompleta, fenocòpies, i l'efecte de factors ambientals, i per tant es fa necessari trobar solucions per reduir al màxim aquesta complexitat. En aquest sentit, la utilització d'una única família extensa i multigeneracional en comptes de moltes famílies petites, ha de facilitar la identificació de *loci* de susceptibilitat.

Expressivitat variable

Alguns estudis han suggerit que FHM, MA i MO han de considerar-se com a entitats separades, independents, però el fet que les diferents categories de migranya segreugin dins de la mateixa família com s'observa a les famílies aquí estudiades (FM1 i FM2) i en moltes altres famílies descrites a la literatura, i que coexisteixin fins i tot, en el mateix individu, indica que pot haver-hi una etiologia comú d'aquestes tres variants de migranya. Aquesta inferència

es recolza en diferents estudis (Kallela et al., 2001; Nyholt et al., 2004; Gargus i Tournay, 2007). Així, tots els pacients de les famílies FM1 i FM2 que compleixen els criteris clínics ICHD-II de la IHS per a les categories FHM, MA i MO, van ser inclosos en les anàlisis de lligament genètic com a "individus afectats". La inclusió de tots els individus, ja siguin MO, MA, o FHM, en la categoria d'afectats, no reflecteix l'alta heterogeneïtat clínica de la migranya però és convenient a l'hora de fer els estudis de lligament en què ens interessa identificar la causa del trastorn teòricament compartida per tots ells. A més, encara que no sigui la tònica general (Lea et al., 2001; Cader et al., 2003; Jen et al., 2004b), s'han trobat individus MO i MA amb mutacions en els gens que normalment causen FHM1 (*CACNA1A*) (Terwindt et al., 1998; Ducros et al., 2001; Kors et al., 2003; Vanmolkot et al., 2003a), i FHM2 (*ATP1A2*) (De Fusco et al., 2003).

El fenotip dels individus que pertanyen a les famílies FM1 i FM2 s'ajusta plenament a la descripció dels criteris diagnòstics de la ICHD-II per a la categoria a la qual pertanyen. L'excepció és el cas índex de la família FM2 (V.2) en què destaca l'inici precoç de la simptomatologia als 10 dies de vida. L'individu manifesta episodis de disfunció neurològica aguda, hipotonia i postració, amb una freqüència d'un cop al mes, i a l'edat de tres anys ja apareix una cefalea intensa que empitjora amb el moviment. Aquestes crisis corresponen molt probablement a una manifestació precoç de les crisis de migranya. Posar atenció en la descripció d'aquests símptomes pot facilitar una detecció més ràpida d'aquests casos precoços i ajudar als pacients de curta edat adoptant el tractament adequat, així com també estalviant exploracions exhaustives, tractaments i angoixes innecessàries al pacient i als seus familiars. Els criteris de la IHS no estan actualment adaptats al diagnòstic i classificació dels infants, probablement per la dificultat de detectar la gran varietat de símptomes que es poden produir i de preveure la seva evolució, i també pel temps necessari per fer els estudis longitudinals d'una malaltia crònica com aquesta, que a més cursa en forma d'episodis. És la tendència a patir episodis recurrents allò que diferencia un pacient migranyós d'una persona sana, que en un moment concret i sota determinades circumstàncies, pot patir un episodi de les mateixes característiques que un individu migranyós.

La detecció precoç dels nens afectats de migranya també és important pels estudis genètics, ja que la penetració del fenotip migranyós és dependent de l'edat i això pot comportar certes dificultats en les anàlisis de lligament. D'altra banda, l'inici primerenc sol indicar més gravetat en el fenotip adult. En el cas del pacient índex de la família FM2, la seva inclusió com a individu

afectat, malgrat no complir estrictament els criteris de la IHS probablement a causa de la seva curta edat, ha ajudat a identificar el *locus* que segrega amb el fenotip de la malaltia.

Penetració incompleta, genocòpies i fenocòpies

En un únic cas de la família FM2, l'individu clínicament asimptomàtic III.6 té descendència afectada (IV.10, IV.13, i V.2) la qual cosa suggereix que podria ser un cas de penetració reduïda de la mutació responsable de la malaltia (veure figura 1 de l'annex a l'article 1, pàgina 99) . Aquesta situació es pot esperar en una malaltia en què els factors ambientals juguen un paper important. També podria ser que la descendència afectada constitueixi en realitat un conjunt de fenocòpies o fins i tot de genocòpies, és a dir, d'individus amb fenotip migranyós causat per raons diferents a les de la resta de pacients de la família, ja sigui per la influència de determinats factors ambientals o per altres factors genètics.

S'esdevé una altra situació peculiar en aquesta genealogia: l'individu III.7, cònjuge de l'individu afectat III.8, també manifesta símptomes de migranya. Aquest individu extern a la família perquè no és descendent de la parella fundadora formada pels individus I.1 i I.2, pot representar també una fenocòpia o una genocòpia, i per tant ni ell ni la seva descendència es van incloure en l'anàlisi estadística dels resultats del lligament genètic, tot i que es van genotipar igualment.

Exclusió de loci de migranya prèviament descrits

Els estudis genètics es van iniciar amb l'anàlisi de tots els *loci* lligats a diverses formes de migranya, descrits prèviament per altres autors als cromosomes 1p21-23 (Ducros et al., 1997), 1q31 (Gardner et al., 1997), 4q24 (Wessman et al., 2002), 6p12-21 (Carlsson et al., 2002), 14q21-22 (Soragna et al., 2003) i 19p13 (Ophoff et al., 1996), amb resultat d'exclusió significativa en la major part dels casos. Amb posterioritat a aquest estudi d'exclusió, però durant el cribratge genòmic que es va realitzar per detectar lligament a les nostres famílies, es van descriure altres *loci* a 11q24 (Cader et al., 2003), 4q21 (Bjornsson et al., 2003), 5q21 (Nyholt et al., 2005), 17p13 (Anttila et al., 2006) i 18p11 (Lea et al., 2005a) que ja no foren analitzats individualment. Un cop feta l'exclusió es procedí al cribratge genòmic de dues famílies grans, una amb pacients amb migranya hemiplègica i/o migranya amb aura i/o migranya sense aura (FM1) i l'altra amb pacients amb migranya amb aura i/o sense aura (FM2).

Les expectatives per mapar el gen responsable de la patologia en una família amb migranya, no poden ser a priori, optimistes, ja que dels molts estudis realitzats fins ara només els

mencionats en el paràgraf anterior ho han aconseguit. La identificació de mutacions en el gen causal concret un cop mapat el *locus* encara sembla tenir més dificultat, ja que fins ara només s'han identificat tres gens en total: el gen *CACNA1A*, tres anys després de la publicació del lligament, el gen *ATP1A2*, que s'identificava sis anys més tard que la identificació del *locus*, i el gen *SCN1A* que es publicava simultàniament amb el mapatge.

Anàlisi de lligament genètic a la família FM1

Els resultats obtinguts en el cribratge genòmic realitzat amb la família FM1 permeten situar un nou gen de migranya al cromosoma 14q32.12-32.13. Els resultats tenen validesa estadística tant en l'anàlisi de *LOD score* de dos punts ($Z_{\max}=3,11$) com en l'anàlisi multipuntual ($Z_{\max}=3,83$). L'anàlisi haplotípic d'aquesta família (FM1) defineix una haplotip de 4,15Mb que està present en tots els membres afectats de la família, independentment de la variant específica de migranya que manifestin (veure figura 1 de l'article 1, pàgina 89). Aquestes dades (conjuntament amb els valors de *LOD score*), demostren de forma convincent l'existència d'un nou *locus* de migranya en aquesta família. L'haplotip de risc per la malaltia també és present en un dels individus asimptomàtics de la família (III.14), un noi de 12 anys d'edat que podria ser presimptomàtic en el moment de l'estudi, o no arribar mai a desenvolupar la malaltia a causa d'una penetració incompleta de la mutació.

El límit distal de la regió crítica està delimitat per una recombinació en l'individu III.10, afectat de FHM, mentre que l'individu III.16, un pacient amb fenotip MA, marca el límit proximal de la regió.

Anàlisi de lligament genètic a la família FM2

Els resultats obtinguts en el cribratge genòmic realitzat amb marcadors de tipus microsatèl·lit a la família FM2 suggereixen la presència d'un nou gen de migranya al cromosoma 14q24.3-34.2. S'obtenen els valors de *LOD score* més elevats de dos punts ($Z_{\max}=2,12$) i multipuntual ($Z_{\max}=2,5$) sobre el marcador D14S67, ubicat a 14q31.3. Aquests resultats no arriben al nivell de significació establert per a la identificació d'un nou *locus* per a una malaltia monogènica ($Z=3$), encara que en són suggestius, ja que un valor de $LOD > 2$ és considera prova suficient per validar el lligament de la malaltia a una regió prèviament descrita com a responsable d'un fenotip similar (Terwilliger i Ott, 1994). D'altra banda, els fenotips MA i MO són freqüents a la població general, i la seva manifestació pot estar influenciada de forma determinant per factors genètics i/o ambientals molt diversos. Aquestes circumstàncies poden explicar la presència de fenocòpies o genocòpies i també casos de penetració incompleta del genotip mutant en aquesta genealogia, situacions que compliquen l'anàlisi de lligament.

L'haplotip compartit pels membres afectats d'aquesta família (FM₂) defineixen una regió crítica per al gen de la malaltia que s'estén 19,45Mb. Tanmateix, els individus III.3 i IV.5 afectats de MO, no son portadors de l'haplotip de risc (veure figura 1 de l'annex a l'article 1, pàgina 99). Aquests individus podrien ser fenocòpies o genocòpies que van en detriment del valor de LOD score màxim que s'obté en l'anàlisi de lligament. Lògicament, aquestes circumstàncies s'han tingut en compte a l'hora de definir els paràmetres de l'anàlisi, de manera que es va considerar una taxa de fenocòpies del 10%, tenint en compte els fenotips migranyosos que hi ha en aquesta família, MA i MO, molt més freqüents a la població general que altres formes de migranya com les de la família FM₁

En aquesta genealogia també es produeix la situació contrària: l'individu asimptomàtic III.6 és portador de l'haplotip de risc i transmet haplotip i malaltia a part de la seva descendència. Si es confirma que aquest és realment un *locus* de migranya, aquest individu representaria un cas de penetració incompleta de la mutació responsable del trastorn. L'individu IV.21, també asimptomàtic i portador de l'haplotip de risc per a la malaltia, podria estar en la mateixa situació (penetració incompleta) que l'individu III.6, o tractar-se d'un cas presimptomàtic, ja que la migranya cursa amb diferents manifestacions clíniques, freqüència i intensitat en funció de l'edat, i aquest individu està encara en edat pediàtrica. L'individu V.2, que no compleix estrictament criteris de migranya de la IHS però que presenta manifestacions que podrien ser precursors de migranya en l'adult, és portador de l'haplotip de risc, de manera que sembla compartir la causa de la malaltia amb la resta de membres afectats, tot confirmant la capacitat de detectar variants precursors de migranya molt abans que es manifesti la simptomatologia inclosa en els criteris de la IHS. Incidentalment, és a partir d'aquest individu, que s'identificà aquesta família ja que, com s'esdevé molts cops, els símptomes precoços són els més atípics i preocupants i en general, és més habitual que es busqui consell mèdic davant una cefalea en una criatura de menys de 5 anys que no pas en un adult.

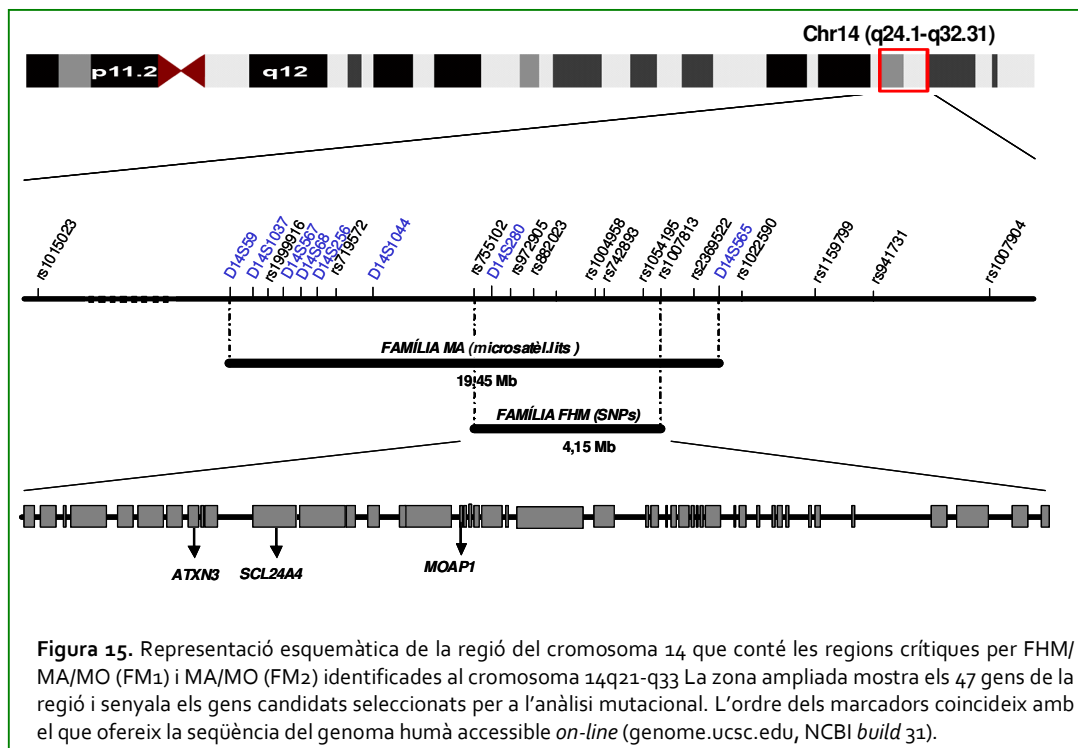
Aspectes metodològics: tipus de marcadors emprats

Pel que fa als tipus de marcadors utilitzats en les anàlisis de lligament, tant en el cas dels SNPs (família FM₁) com en el dels marcadors microsatèl·lits (família FM₂), s'han assolit resultats positius. En ambdós casos una única regió crítica ha destacat clarament de la resta del genoma. Encara que en l'anàlisi dels marcadors microsatèl·lits (MD-10 Linkage Mapping Set v5, Applied Biosystems, 400 marcadors) s'hagi utilitzat un nombre de marcadors un ordre de magnitud per sota del nombre de SNPs (Linkage IVb Gold Panel, Illumina, 6008 SNPs), els primers són molt més informatius (una heterozigositat mitjana del 73% contra un 43%). Així

doncs, la relació entre la densitat dels marcadors (alta en els SNPs, baixa en els microsatèl·lits) i la seva heterozigositat (baixa en els SNPs, alta en els microsatèl·lits) probablement equilibra l'aportació de les dues col·leccions en les anàlisis (Kruglyak, 1997). En canvi, en l'estudi d'haplotips per definir els punts de recombinació que delimiten la possible regió crítica, la col·lecció de microsatèl·lits es queda més curta, i es fa necessari, en el cas de la família FM2, augmentar la densitat dels marcadors genotipats, treball que no forma part d'aquesta tesi.

Definició de la regió crítica: solapament dels loci de les famílies FM1 i FM2

Les regions crítiques definides a les famílies FM1 i FM2 se solapen, de tal manera que el segment genòmic situat 14q32.12-32.13 que cosegrega amb el fenotip migranyós (FHM, MA i MO) a la família FM1, està inclòs en el *locus* 14q24.3-34.2 que cosegrega amb el fenotip migranyós (MA i MO) a la família FM2 (figura 15).



L'interval de solapament de 4,15Mb de la regió 14q31.2-31.3 conté un mínim de 47 gens (genome.ucsc.edu, NCBI *build* 31), alguns d'ells de funció encara desconeguda. Basant-nos en la funció, el patró d'expressió i la possible relació amb la patogènesi de la migranya, es va seleccionar el gen *SLC24A4*, que codifica una proteïna de membrana intercanviadora d'ions sodi, potassi i calci, com a principal gen candidat per a la seva anàlisi mutacional. Encara que

la seqüenciació de dos individus portadors de l'haplotip de risc en cada una de les famílies no va permetre identificar cap canvi potencialment patogènic, hi ha encara la possibilitat que els canvis estiguin situats en una zona reguladora o en un intró del mateix gen, o que es tracti de mutacions que defugin la detecció per PCR i seqüenciació directa. Si ens basem en els gens coneguts com a causants de FHM, així com en els gens implicats en altres trastorns neurològics paroxístics com l'atàxia episòdica o l'epilèpsia, sembla evident que el gen *SLC24A4* és un candidat idoni. Això no obstant, altres gens de la regió crítica que codifiquen subunitats formadores de canals iònics o molècules que interaccionen o estan implicades en la regulació de la funció dels canals, també són bons candidats. La funció d'un canal iònic, a més, és susceptible a diversos factors externs com els canvis de pH, la concentració d'ions i la temperatura entre d'altres, la qual cosa fa els canals molt interessants com a proteïnes candidates per a una malaltia en què els factors ambientals tenen un paper rellevant. A més, petites variacions en la funció dels canals iònics podrien contribuir a l'expressivitat altament variable del fenotip, típica dels trastorns migranyosos.

Un altre candidat a l'anàlisi mutacional és el gen *ATXN3*, que codifica l'ataxina 3, proteïna implicada en la regulació de la transcripció i en processos de deubiquitinació (Wang et al., 2006) i en què s'ha descrit una amplificació del triplet CAG que codifica per glutamina en pacients amb SCA3 o malaltia de Machado-Joseph (Kawaguchi et al., 1994; Paulson, 2007). Aquest gen és especialment interessant perquè, cas de trobar-hi mutacions associades a HM, es produiria un cert mimetisme amb el gen *CACNA1A*, en què ja s'ha senyalat que diferents mutacions, generalment puntuals, són causa de FHM, mentre que l'amplificació d'un triplet codificant CAG inestable causa atàxia espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA6). Aquest és probablement el següent gen a estudiar en aquestes famílies. El gen *FBLN5*, que codifica una proteïna d'unió al calci i el gen *ITPK1*, que codifica una cinasa que regula indirectament els canals de clor activats per calci de la membrana plasmàtica, també són bons candidats per a l'anàlisi mutacional.

La descoberta d'un nou *locus* fins ara no descrit, situat a 14q32, aporta més evidències a la reconeguda heterogeneïtat genètica de la migranya, encara que el fet que les dues famílies catalanes amb fenotips similars però no idèntics, tinguin el *locus* del trastorn a la mateixa regió és esperançador en el sentit que famílies d'una mateixa regió geogràfica podrien tenir una mateixa causa genètica. Caldrà prosseguir la recol·lecció d'altres famílies catalanes o espanyoles amb migranya, amb l'objectiu d'identificar més casos de lligament a aquesta regió genòmica. L'anàlisi haplotípica d'aquestes famílies podria permetre acotar la regió crítica del cromosoma 14 a través de la identificació de recombinacions informatives, reduint així el

número de gens candidats a ser analitzats. Així mateix i tenint en compte que es tracta d'un trastorn dominant, també és prioritari incorporar altres individus que puguin ampliar les famílies ja analitzades, per augmentar les possibilitats de trobar una recombinació informativa que pugui acotar la regió i dirigir-nos més ràpidament al gen causant de la malaltia.

Una altre estratègia a seguir, per acotar més la regió crítica de la família FM2, serà fer un mapatge fi de les recombinacions que delimiten l'haplotip de risc utilitzant més polimorfismes, però difícilment arribarem a acotar la regió per sota del segment de 4,15Mb de la família FM1.

Comparació amb loci de migranya descrits prèviament

Comparant la regió acotada a les famílies FM1 i FM2 amb estudis de lligament previs a diferents categories de migranya, trobem dos *loci* situats en el mateix braç del cromosoma 14. El primer, a 14q21, que predisposa a MO en una família italiana (Soragna et al., 2003) ja s'havia exclòs en totes dues famílies espanyoles abans d'iniciar el cribratge genòmic. Considerant els haplotips associats a la malaltia, aquest *locus* dista més de 34Mb del *locus* definit a la família FM1 i més de 13Mb si considerem la regió crítica de la família FM2. El segon *locus*, a 14q22 (Lea et al., 2005a) presenta només lligament suggestiu de la regió ($Z_{\max}=2,06$; $p=0,002$) a un conjunt de símptomes de migranya en diverses famílies australianes. En aquest cas no es van fer servir les categories establertes per la IHS sinó que es van considerar unes categories resultants de l'anàlisi de classes latents (Nyholt et al., 2004). Encara que en aquesta publicació (Lea et al., 2005a) no es mostren els haplotips, i per tant no es pot saber fins a on arriba exactament la regió que cosegrega amb el fenotip, la regió definida sembla no solapar-se amb la regió acotada en el nostre treball. En qualsevol cas, es tracta d'un lligament poc significatiu a nivell estadístic i d'un fenotip que no s'ha seleccionat seguint les directrius de la IHS per al diagnòstic de migranya.

Donat que diferents regions relativament properes al braç llarg del cromosoma 14 estan lligades a fenotips similars, podria ser que la regió 14q allotgés un *cluster* de gens que conferís susceptibilitat a la migranya. Això podria fins i tot explicar en part la variabilitat fenotípica existent entre els individus d'una mateixa família que són portadors d'una mateixa mutació. El fenotip podria estar en funció de la grandària de la regió heretada i de les variants funcionals en diferents gens continguts en ella.

B. ANÀLISI MUTACIONAL I FUNCIONAL DE GENS PRÈVIAMENT RELACIONATS AMB LA MIGRANYA

El cribratge del gen *CACNA1A* en dues sèries de pacients espanyols de 27 individus cadascuna ha permès identificar 7 mutacions dominants en heterozigosi, totes elles de canvi de sentit. Els individus de la primera sèrie manifesten diferents variants de migranya (HM, MA i CPS) principalment familiars. Tres de les 7 mutacions s'han identificat en pacients d'aquesta sèrie i són responsables del fenotip FHM: p.Val581Met, p.Tyr1245Cys i p.Cys1534Ser. Destaca la importància d'una d'elles, que es va identificar en un individu que manifestava símptomes de BPT quan era lactant, més tard va desenvolupar BPV i actualment presenta FHM. Els 27 pacients de la segona sèrie analitzada són afectats de EA2 i s'hi han detectat quatre nous canvis potencialment patogènics: una mutació EA2 ja descrita anteriorment, p.Gly638Asp; una substitució en un altre pacient EA2, p.Pro1011Ala, que curiosament figura a les bases de dades de polimorfismes humans tot i que no hi apareixen detalls sobre les freqüències al·lèliques; un canvi detectat en un pacient que manifesta la combinació de fenotips EA2 i FHM, p.Thr501Met; i finalment un canvi ja descrit anteriorment, p.Arg583Gln, identificat en aquest treball en un pacient amb EA2 i MA.

És ben conegut que el gen *CACNA1A* és responsable de com a mínim, dues malalties neurològiques episòdiques, FHM i EA2, i una de progressiva, SCA6. Que en tinguem coneixement, fins ara no s'ha realitzat cap cribratge mutacional del gen *CACNA1A* en pacients espanyols, probablement per la dificultat de reclutar una sèrie numerosa de pacients amb trastorns tan rars. Els 54 pacients estudiats en aquesta secció tenen fenotips FHM, EA2, CPS i BM, i van ser estudiats per tal d'esbrinar el pes que té el gen *CACNA1A* a les famílies i casos espanyols amb fenotips que ja s'havien relacionat amb aquest gen, i per esbrinar la possible relació genètica entre CPS i BM i altres variants de migranya.

El gen CACNA1A i la migranya hemiplègica (HM)

En aquest treball s'han identificat dues mutacions *de novo* (p.Val581Met i p.Tyr1245Cys) i una mutació prèviament citada (p.Cys1534Ser) en el gen *CACNA1A* en un conjunt de 27 pacients amb fenotips principalment familiars de HM, BM i CPS (veure taula 1 de l'article 2, pàgina 133). Aquest gen, que presenta mutacions en 3 dels 11 individus amb FHM analitzats en aquesta sèrie, se situa com a gen causant de la FHM en el 27% de les famílies espanyoles, que fins ara

no havien estat estudiades. El percentatge és important però allunyat de la noció àmpliament acceptada que mutacions en el gen *CACNA1A* són presents en el 50% dels casos amb FHM (revisat a Pietrobon, 2007). Tanmateix, altres cribratges mutacionals d'aquest gen en sèries d'individus amb FHM com el realitzat per Ducros et al. (1999) i Thomsen et al. (2007), han donat resultats similars als obtinguts a la sèrie que aquí es presenta, 4/12 (33%) i 6/42 (14%) respectivament. La proporció d'individus que presenten mutació al gen *CACNA1A* disminueix considerablement, sent menor del 5%, en casos esporàdics o sense familiars afectats de la mateixa variant de migranya (SHM) (Ophoff et al., 1996; Carrera et al., 1999; Terwindt et al., 2002; Jen et al., 2004b).

En consonància amb aquesta afirmació, no es va detectar cap mutació en el gen *CACNA1A* en 10 individus SHM analitzats, malgrat que 7 d'ells comptaven amb història familiar positiva per diferents variants de migranya no hemiplègica.

El gen CACNA1A i les síndromes periòdiques de la infància (CPS)

Vuit individus inicien els símptomes amb episodis equivalents a la migranya en l'edat pediàtrica, reconeguts com a CPS a l'última versió dels criteris ICHD (2004) de la IHS. El BPT, no inclòs com a CPS "de ple dret" als ICHD-II, ha estat considerat una CPS en el nostre treball donada la seva presentació, característicament en l'edat pediàtrica, i l'abundant literatura que documenta que molts dels pacients amb BPT evolucionen a altres formes de CPS i/o fenotips de migranya durant l'edat pediàtrica o en arribar a adults (Fenichel, 1967). Dels 4 pacients de la sèrie que inicien els símptomes amb episodis de BPT en el període de lactant, 3 manifesten BPV (codi 1.3.3 de la ICHD-II) a l'edat preescolar i el quart manifesta HM a l'edat de 14 anys (figura 16). Un dels tres pacients BPT que va evolucionar a BPV és actualment un pacient FHM, i aquest individu és, a més, portador d'una nova mutació identificada en el gen *CACNA1A*: p.Tyr1245Cys. L'evolució de BPT a BPV, i de BPT o BPV a variant de migranya a l'adult, ja havia estat descrita per altres autors, però mai abans s'havia identificat una mutació en un individu amb CPS. Sí que s'havia descrit l'existència d'un individu amb BPT pertanyent a una família en què el fenotip FHM cosegrega amb una mutació al gen *CACNA1A*, però el pacient BPT en concret no fou estudiat a nivell genètic (Giffin et al., 2002).

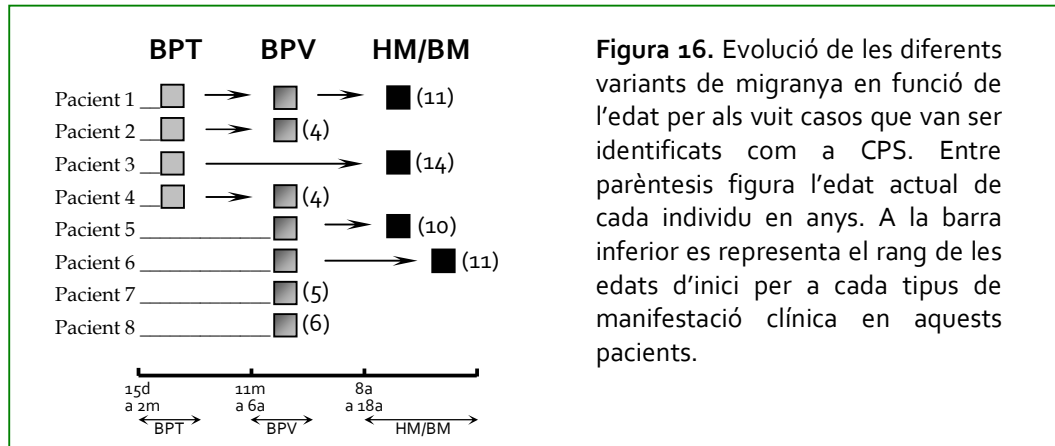


Figura 16. Evolució de les diferents variants de migranya en funció de l'edat per als vuit casos que van ser identificats com a CPS. Entre parèntesis figura l'edat actual de cada individu en anys. A la barra inferior es representa el rang de les edats d'inici per a cada tipus de manifestació clínica en aquests pacients.

L'evolució observada en els individus BPT que es presenten en aquesta tesi i sobretot la identificació, per primera vegada, d'una nova mutació en el gen *CACNA1A* en un d'aquests pacients, són elements valuosos de cara a la consideració de BPT com a equivalent migranyós a l'edat pediàtrica. De fet aquests resultats podrien contribuir a que BPT passi de ser una categoria de l'apèndix dels ICHD-II (codi A1.3.5) on s'havia inclòs amb l'ànim d'encoratjar els investigadors a aportar noves proves per establir la seva relació amb la migranya, a ser considerat com a fenotip amb categoria CPS en la propera actualització dels criteris ICHD de la IHS.

Dels set individus que manifesten BPV, dos evolucionen a HM i un a BM. Els quatre restants tenen entre 4 i 6 anys, i encara no han arribat a l'edat en què és comú manifestar el fenotip de l'adult (figura 16). L'estudi clínic longitudinal d'aquests pacients contribuirà sens dubte al coneixement de la història natural d'aquest trastorn i la seva relació temporal amb la migranya, aspectes que encara són objecte d'investigació en el moment actual.

El gen CACNA1A i l'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2)

En un altre conjunt de 27 pacients amb fenotip EA2 s'han detectat dues noves mutacions (p.Gly638Asp i p.Thr501Met), un canvi anteriorment descrit com a polimorfisme (p.Pro1011Ala) i una mutació també descrita prèviament (p.Arg583Gln), que és el segon canvi més freqüent al gen *CACNA1A*. Així, el gen *CACNA1A* és responsable del fenotip EA2 en un 14,8% dels pacients espanyols analitzats aquí per primera vegada, que no han estat preseleccionats per anàlisi de lligament al gen o per criteris de comorbiditat amb migranya com es fa en molts dels estudis publicats. Aquest percentatge està en línia o fins i tot supera el

trobat en altres estudis mutacionals de la regió codificant del *CACNA1A* en pacients EA2 (Kaunisto et al., 2004; Eunson et al., 2005).

Si considerem els individus que combinen història d'EA2 i migranya, el percentatge d'èxit en la identificació de mutacions al gen *CACNA1A* és molt més elevat que si considerem individus amb un o altre fenotip. Així, en aquesta sèrie de 27 pacients amb EA2, s'han detectat mutacions en el gen *CACNA1A* en 2 de 4 individus (50%) que a més tenen migranya si considerem BPT com a variant de migranya, o en 2 de 2 individus (100%), si considerem la combinació de EA2 i variants de migranya amb aura. De fet, quan hom se submergeix en la literatura, i revisa els fenotips analitzats en els treballs que troben un percentatge elevat de mutacions en el gen *CACNA1A*, s'observa que es tracta de pacients FHM on hi concorre afectació cerebel·losa, o bé han estat seleccionats en base al possible lligament de la seva família, normalment extensa, al *locus* 19p13, o fins i tot compleixen ambdues premisses. Així, Ducros et al. (2001) identifiquen mutacions en 15 de 16 famílies amb FHM, signes cerebel·losos i lligament al gen *CACNA1A*. El recull de mutacions fins ara identificades en el gen *CACNA1A* com a causants d'EA2 està al voltant de les 50, un terç de les quals estan presents en individus amb història de migranya o, en més baixa proporció, epilèpsia.

Així, tot i que el gen *CACNA1A* sembla ser el responsable del fenotip atàxia cerebel·losa (CA)-FHM amb lligament genètic al cromosoma 19p13 en gairebé tots els pacients analitzats, no és el gen principal del fenotip EA2 en famílies espanyoles, com tampoc no ho havia estat en famílies escandinaves (Kaunisto et al., 2004; Eunson et al., 2005). Aquests resultats posen de nou de manifest l'elevada heterogeneïtat genètica no al·lèlica –i al·lèlica- d'aquest trastorn.

Les mutacions p.Gly638Asp i p.Pro1011Ala es van identificar en dos pacients EA2 d'inici tardà sense història familiar positiva. La mutació p.Thr501Met es va identificar en un pacient amb antecedents personals i familiars de EA2 i FHM. Per últim, la mutació prèviament descrita p.Arg583Gln es va identificar en un pacient amb símptomes de EA2, CA i MA. Aquest pacient pertanyia a una família en què la mutació estava present en tots els individus afectats de qualsevol combinació dels fenotips EA2, CA, MA i HM, i no era present en cap dels individus asimptomàtics de la família.

Descripció de les variants CACNA1A identificades

Les set mutacions identificades en el gen *CACNA1A* en pacients espanyols, p.Thr501Met, p.Val581Met, p.Arg583Gln, p.Gly638Asp, p.Pro1011Ala, p.Tyr1245Cys i p.Cys1534Ser, són totes de canvi de sentit. Hi ha diversos indicis que reforcen la idea que aquestes mutacions tenen, efectivament, una relació causal amb la patologia:

La mutació p.Thr501Met, identificada en un pacient amb fenotip EA2 i FHM implica la substitució de l'aminoàcid treonina 501, polar i sense càrrega, per l'aminoàcid no polar metionina. Aquesta mutació es troba en el segment S1 del domini II (DII-S1), segment on fins ara no s'havia descrit cap mutació causant de FHM a excepció d'una altra de les mutacions identificades en aquest treball. En canvi, sí que s'han descrit mutacions truncants responsables del fenotip EA2 en els segments S1 dels dominis DII i DIII (Ophoff et al., 1996; Denier et al., 1999).

La mutació p.Val581Met, identificada en un pacient amb fenotip FHM, implica la substitució de l'aminoàcid valina 581 per una metionina. El canvi se situa en el segment 4 del domini II (DII-S4). Els segments S4, regions transmembrana en hèlix α que formen el sensor de voltatge del canal, són *hotspots* per les mutacions responsables de FHM (figura 10). El residu 581 però, té una particularitat que el diferencia de la resta de mutacions fins ara identificades en els segments S4 (residus 192, 195, 583, 1347, 1661, 1664 i 1668), i és que l'aminoàcid afectat és una valina enlloc d'una arginina. Segons les prediccions realitzades mitjançant el programa PSIPRED (www.psipred.net), aquest canvi podria provocar un escurçament d'una estructura secundària en hèlix α , afectant directament les propietats bàsiques del canal.

La mutació p. Arg583Gln s'ha identificat en el cas índex i en quatre membres afectats més de la família en què segreguen combinacions dels fenotips EA2, CA, HM i MA (veure figura 1 de l'annex a l'article 2, pàgina 142). La mutació és absent en els 5 individus asimptomàtics de la família. La correlació fenotip-genotip és similar a la d'altres famílies portadores de la mateixa mutació. Aquesta és la segona mutació més recurrent a la proteïna CACNA1A, i va ser descrita per primer cop en una família amb FHM i PCA d'inici tardà (Battistini et al., 1999). S'ha identificat en unes altres 5 famílies amb FHM/PCA (Ducros et al., 2001; Alonso et al., 2003; Thomsen et al., 2007) i en 1 cas de SHM amb afàsia i confusió episòdiques (Terwindt et al., 2002). L'arginina 583 està en el sensor de voltatge, al segment 4 del domini II (DII-S4) i és substituïda per una glutamina. Els estudis funcionals d'aquesta mutació (Kraus et al., 2000) revelen un canvi en la dependència de voltatge d'activació i d'inactivació cap a potencials més

negatiu com a conseqüència de la neutralització del residu 583 que està carregat positivament en el canal WT, i una disminució de la recuperació de la inactivació. El flux anòmal de calci, sobretot en situacions d'alta activitat, explicaria el caràcter paroxíctic del trastorn i el desencadenament dels episodis per estímuls sensorials o emocionals (Kraus et al., 2000).

La mutació p.Gly638Asp es va detectar en un pacient amb EA2. El residu Gly638 està situat al llaç extracel·lular que uneix els segments transmembrana S5 i S6 del domini II de la subunitat $\alpha 1A$ del canal. Aquest segment està implicat en la formació del porus del canal i el canvi de càrrega i conformació causats per la substitució d'una glicina no carregada i apolar per un aminoàcid aspartat carregat negativament, podria afectar l'obertura i tancament del canal i la selectivitat iònica. Estudis funcionals preliminars realitzats pel Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties de la Universitat Pompeu Fabra i el Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona dirigit pel Dr. Valverde, amb qui hem establert una col·laboració, apunten a una disminució de la conductància del canal i per tant, a una pèrdua de funció com és d'esperar en les mutacions que causen fenotip EA2 (resultats no publicats).

La mutació p.Pro1011Ala identificada en un pacient amb EA2 està inclosa a les bases de dades de SNPs amb el codi rs28413664, però aquest polimorfisme no ha estat validat i no consta informació sobre les freqüències al·lèliques, el número de cromosomes analitzats ni la població estudiada (*NCBI dbSNP build 128*). Podria ser que el canvi identificat sigui en realitat una variant neutra i no una mutació patogènica, però hi ha diversos indicis que fan pensar en el contrari: el residu Pro1011 està situat al llaç intracel·lular que uneix els dominis DII i DIII, dintre del domini d'interacció (aminoàcids 722 a 1036) del canal amb les proteïnes SNARE, reguladores de la seva activitat. Si la mutació alterés aquesta interacció, el canal restaria menys inhibit per aquestes proteïnes i s'induiria una major alliberació de neurotransmissor a l'espai sinàptic. La prolina és un aminoàcid estructuralment molt diferent a l'alanina que substitueix i acostuma a introduir colzes a les proteïnes, de manera que seria lògic pensar en un canvi en la conformació d'aquesta regió i per tant, en una afectació de la interacció amb les proteïnes reguladores del canal.

La mutació p.Tyr1245Cys fou identificada en un pacient que seqüencialment i en funció de l'edat va expressar diferents variants de migranya: BPT, BPV i FHM. La substitució del residu no carregat polar tirosina per l'aminoàcid no polar cisteïna que pot formar enllaços disulfur amb d'altres cisteïnes, podria provocar un canvi conformacional crític en el primer aminoàcid

d'una hèlix α transmembrana. Insòlitàment, aquesta mutació es troba en el segment S1 del domini III (DIII-S1). Fins ara no s'ha descrit cap altra mutació causant de FHM en cap segment S1 de cap domini de la subunitat α_{1a} del canal de calci $Ca_v2.1$.

La mutació p.Cys1534Ser va ser identificada en un pacient que debuta amb símptomes de MA i que més tard presenta episodis de FHM. Aquesta mutació s'havia detectat prèviament en 3 individus d'una mateixa família, un afectat de FHM i els altres dos de FHM i EA (Dichgans et al., 2005b). D'aquesta mutació destaca la posició del residu afectat, que se situa en el llaç intracel·lular que uneix els dominis III i IV de la subunitat α_{1a} del canal. Cap altra mutació causant de FHM es troba en aquest domini intracel·lular de la proteïna CACNA1A, però la posició del residu mutat mimetitzava la localització de l'única mutació causant de FHM descrita a la proteïna SCN1A (p.Gln1489Lys), d'estructura molt similar a la proteïna CACNA1A.

Mutacions causants de patologia o polimorfismes neutres?

A més dels indicis comentats a l'apartat anterior, s'han recollit altres evidències a favor de la patogenicitat d'aquestes variants: 1) s'ha confirmat l'absència de totes les variants aquí esmentades en 128 cromosomes d'individus control en què s'ha exclòs específicament història personal i familiar de qualsevol tipus de migranya. Els canvis també estan absents en els 107 cromosomes de la resta de pacients estudiats. 2) Els canvis identificats aquí no estan presents, a excepció de la variant p.Pro1011Ala comentada més amunt, en les bases de dades públiques de SNPs, indicant que aquests canvis probablement no són variants polimòrfiques presents a la població general. 3) En cap cas s'ha identificat una segona variant potencialment patogènica a la resta del gen; alguns canvis d'aminoàcid identificats són polimorfismes reconeguts i per tant no s'han considerat "mutacions patogèniques". 4) Els residus d'origen implicats estan molt conservats a l'evolució, tant a nivell intraespecífic (subunitats CACNA1B, E, D, F C i S), a excepció de les variants p.Pro1011Ala (no conservada) i p.Tyr1245Cys, (conservada només en les subunitats més properes al CACNA1A: CACNA1B i E), com a nivell interespecífic (subunitats α_1A de l'home –*Homo sapiens*-, la vaca– *Bos taurus* -, el ratolí –*Mus musculus*-, la rata –*Rattus norvegicus*-, el conill –*Oryctolagus cuniculus*-, el peix zebra –*Danio rerio* - i la mosca de la fruita –*Drosophila melanogaster*-), la qual cosa indicaria probablement una importància funcional i/o estructural. La no conservació intraespecífica del residu Pro1011 no descarta necessàriament aquest canvi com a causant del fenotip, perquè podria indicar que aquesta regió de la proteïna té unes característiques particulars a cada subunitat α_1 que

proporcionarien funcions específiques, com per exemple una sensibilitat diferencial a la regulació per proteïnes presents només en el teixit on s'expressa cada subunitat.

En general, s'accepta que un canvi d'aminoàcid és potencialment patogènic si el nou residu no està present en població sana (les variants polimòrfiques neutres, no sotmeses a selecció, acostumen a tenir una freqüència superior a l'1%), si té propietats físico-químiques diferents al residu original, si altera l'estructura secundària o terciària de la proteïna, i si el residu original està conservat en l'evolució. No obstant, tot i l'acumulació d'indicis a favor de la patogenicitat de les mutacions identificades en aquest treball, només una aproximació funcional que determini les propietats electrofisiològiques dels canals mutats permetrà assegurar la seva relació amb el fenotip episòdic migranyos i/o atàxic. En aquest sentit, s'està duent a terme un protocol de mutagènesi dirigida per introduir els diferents canvis en una molècula de cDNA que conté la regió codificant del gen *CACNA1A*, i que es clonen en un vector d'expressió de mamífer. A continuació, i gràcies a una col·laboració amb el Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties de la Universitat Pompeu Fabra dirigit per Dr. Valverde, es transfecten cèl·lules HEK293 (ronyó embrionari humà) que pràcticament no expressen el canal, i es comprova si la proteïna se sintetitza correctament, si s'ubica a la membrana plasmàtica de la cèl·lula i si té o no una activitat conductora normal.

Diversos autors han realitzat estudis funcionals de mutacions de canvi d'aminoàcid identificats en pacients FHM i han observat en general alteracions de la cinètica d'inactivació del canal, que esdevindria més lenta com a conseqüència del canvi. Tot i que això faria que el corrent de calci que passa a través de cada canal individual augmenti, a nivell cel·lular el corrent està clarament disminuït, tot indicant que les mutacions afectarien d'alguna manera els nivells d'expressió, la vida mitjana o la mobilització de la proteïna a la membrana (Tottene et al., 2002).

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

Tenint en compte que a la sèrie de 27 pacients afectats de HM, CPS i BM només vam trobar mutacions en el gen *CACNA1A* en 3 dels individus, i donat que el gen *ATP1A2* (polipèptid α de l'ATPasa transportadora de sodi/potassi) està implicat en FHM però també en d'altres variants de migranya, es va dur a terme l'anàlisi mutacional d'aquest gen en els 24 individus restants. El gen *ATP1A2*, és la causa de FHM en el 7 - 42% de pacients que pertanyen a sèries on ja s'ha descartat prèviament l'existència de canvis patogènics en el gen *CACNA1A* (Riant et al., 2005; Pierelli et al., 2006; Thomsen et al., 2007) i no obstant no sembla estar implicat en les famílies

amb FHM o en els casos amb SHM de la nostra sèrie: no vam poder trobar cap individu portador d'un canvi potencialment patogènic en aquest gen.

Fins ara s'havien identificat al gen *SCN1A* (subunitat α del canal de sodi neuronal de tipus I) més de 160 mutacions que causen diferents variants d'epilèpsia, i només una (p.Gln1489Lys) que és responsable del fenotip FHM, detectada en tres famílies aparentment no relacionades (Dichgans et al., 2005a; Vanmolkot et al., 2007). Cap dels 24 individus espanyols analitzats és portador d'aquest canvi. Encara està per veure si aquest gen, principalment implicat en l'epilèpsia, pot jugar un paper més o menys rellevant en la FHM o si els casos descrits constitueixen un fet inusual.

Heterogeneïtat genètica de la migranya i de l'atàxia episòdica

El fet de que només en 3 individus dels 27 de la sèrie amb diferents variants de migranya s'hagi trobat mutació en algun dels tres gens implicats fins ara en aquests fenotips, així com en tan sols 4 dels 27 individus amb fenotip EA2 analitzats pel gen *CACNA1A*, confirma l'elevada heterogeneïtat genètica d'aquestes patologies neurològiques episòdiques. D'altra banda, resultats com els obtinguts en l'anàlisi de lligament a la família FM1, en què descrivim un nou *locus* migranyós, apunten efectivament cap a una elevada heterogeneïtat genètica.

Aquesta heterogeneïtat podria explicar-se per l'elevada complexitat de les vies fisiològiques relacionades amb la cefalea, de tal manera que alteracions en punts diversos d'aquestes vies podrien conduir finalment a un mateix fenotip en individus diferents, sempre en el benentès que cada individu tindria un sol gen mutat. No podem descartar però, que alguns dels casos estudiats no tinguin de fet una etiologia monogènica sinó complexa, amb diversos gens alterats i una contribució rellevant de factors ambientals. En aquestes situacions, la combinació de diferents variants polimòrfiques en diferents gens d'un individu concret serien les responsables del fenotip, i l'enfoc adequat per a estudiar-les no seria l'anàlisi de lligament/anàlisi mutacional sinó els estudis d'associació genètica.

Els casos aquí identificats que pertanyen a famílies amb una herència aparentment autosòmica dominant del trastorn serien molt probablement monogènics, però una proporció important dels individus inclosos en aquest estudi no tenen familiars afectats o bé no tenen un estudi familiar al darrera.

Finalment, hem de tenir en compte també que el baix percentatge de mutacions identificades també podria ser degut en part a les limitacions intrínseques de l'estratègia d'anàlisi mutacional emprada, que passaria per alt grans alteracions (reordenaments genòmics, grans

delecions o insercions, etc.) i mutacions situades a les zones intròniques o reguladores del gen que no han estat estudiades. Alguns d'aquests canvis podrien tenir influència sobre la transcripció del gen implicat i potser es podrien detectar a nivell de RNA, però aquest enfoc experimental presenta dificultats pràctiques perquè en molts casos l'accés a mostres de RNA del pacient és complicat, i a més aquests gens poden expressar-se només –o fonamentalment- en el sistema nerviós central.

Hipotèrmia episòdica espontània amb hiperhidrosi (ESHH) amb el canvi p.Pro1138Aa al gen CACNA1A: un nou precursor de migranya?

S'ha identificat una mutació en el gen *CACNA1A* en una pacient que des dels 7 mesos de vida presenta episodis recurrents d'hipotèrmia lleu (34-35°C), pal·lidesa, diaforesi profunda, hipoactivitat i un cert grau d'instabilitat. Les crisis tenen una durada de minuts a poques hores i van seguides d'una fase de somnolència després de la qual es resol l'episodi, com passa freqüentment en l'atac de migranya. Als 5 anys d'edat, la freqüència d'aquests episodis disminueix per sota d'un episodi al mes i la pacient comença a desenvolupar episodis de cefalea d'intensitat moderada, de 2 hores de duració.

Diversos familiars del cas índex presenten trastorns paroxístics com epilèpsia idiopàtica focal (germà), MO (pare), cefalea tensional (mare) i MA ocasionalment acompanyada de vertigen (àvia materna i la germana i filla d'aquesta) (veure figura 1 de l'article 3, pàgina 166).

La similitud en la fase resolutòria dels episodis, el caràcter paroxístic, el ritme circadià dels episodis, que es donen amb una periodicitat temporal i horària més o menys constant (freqüència d'1-4/mes, gairebé sempre durant la nit), els canvis de comportament, els símptomes acompanyants com hipotonia, pal·lidesa o somnolència i la instabilitat observades en la pacient fan pensar en una canalopatia com a responsable del fenotip.

A part de la pròpia evolució clínica del probandus, el ventall de manifestacions paroxístiques observades en els seus familiars, la història familiar positiva per diferents variants de migranya i la identificació d'una mutació en el gen *CACNA1A*, responsable del fenotip FHM, recolzen fortament la idea que aquesta pacient encara en edat pediàtrica pot estar manifestant una síndrome precursora de la migranya (CPS). L'esmentat gen és a més, responsable del fenotip EA2 i SCA6, cosa que podria explicar també la 'certa' instabilitat de la marxa observada en la pacient i el vertigen episòdic present en els familiars.

Els mecanisme pel qual es desencadena aquesta patologia és encara desconegut. Com que es tracta d'un defecte en la termoregulació s'especula que podria haver-hi una disfunció hipotalàmica i que la hiperhidrosi s'explica per la lluita del cos per mantenir la baixa temperatura corporal que erròniament marca el centre termoregulador, situat a l'hipotàlem. Es creu que l'hipotàlem està implicat en els mecanismes que inicien l'atac de migranya (Overeem et al., 2002) i altres cefalees primàries com la cefalea acuminada o en *clusters* (CH). La presentació nocturna dels episodis que manifesta la pacient també aniria en línia amb una disfunció hipotalàmica, tal com també succeeix a la CH.

Els pocs casos de ESHH existents a la bibliografia apunten a una relació amb la migranya. S'han descrit quatre casos amb coincidència de ESHH i CPS (vòmits cíclics), tres d'ells amb història familiar positiva de MA (Ruiz et al., 2003). Un altre cas presentava història familiar positiva de migranya en el pare i d'atacs de pànic en altres membres de la família (Greenberg i Rittichier, 2003).

La ESHH també s'ha proposat com una variant d'epilèpsia d'origen al diencèfal (Kloos, 1995), però fins i tot en aquest cas la relació causal amb el gen *CACNA1A* no seria sorprenent, ja que mutacions en aquest gen s'han associat també a fenotips epilèptics (Jouveneau et al., 2001; Kors et al., 2004).

Si es confirma que la ESHH és efectivament una CPS, aquest cas seria només el tercer pacient descrit a la bibliografia amb una mutació aparentment causant d'un fenotip equivalent o precursor de migranya (Giffin et al., 2002; E Cuenca-León, 2008), totes elles en el gen *CACNA1A*.

Encara que només l'estudi funcional de la mutació identificada pot confirmar l'efecte de la substitució aminoacídica sobre el canal de calci, hi ha evidències a favor de la patogenicitat del canvi:

- 1) La substitució de l'aminoàcid Pro¹¹³⁸ situat en una regió rica en girs (*coils*) per una alanina, probablement provoca un canvi conformacional a la proteïna *CACNA1A*. La prolina, un residu amb una cadena lateral de tipus cíclic, actua sovint com un disruptor estructural tot introduint colzes a la proteïna.
- 2) El canvi localitzat al mateix llaç amb el qual interaccionen les proteïnes del complex SNARE, podria interferir en la regulació del canal per aquestes, i la taxa d'alliberació de neurotransmissors per la neurona, que depèn en part de l'entrada de calci a través del canal, podria veure's fortament afectada.

- 3) La mutació està molt conservada en l'evolució, a nivell interespecífic en ratolí –*Mus musculus*-, rata –*Rattus norvegicus*-, vaca –*Bos taurus*-, i conill –*Oryctolagus cuniculus*- i no ho està a nivell intraespecífic, tot indicant rellevància i especificitat funcional, respectivament.
- 4) Per últim, la probabilitat que aquest canvi sigui una variant polimòrfica neutra present a la població general és baixa, ja que el canvi està absent en 200 cromosomes d'individus control analitzats.

L'anàlisi funcional d'aquestes mutacions i el seguiment longitudinal a mitjà/llarg termini d'aquests pacients revelarà si aquest canvi és responsable de la patologia i si la ESHH és un precursor de migranya o d'una altra cefalea primària com la CH, precursor d'una forma d'epilèpsia, o si es tracta d'una canalopatia amb identitat pròpia.

Canvi p.Ala454Thr al gen CACNA1A: un modulador del fenotip migranyós?

S'ha identificat una mutació en el gen *CACNA1A* en una mare (I.2) i una filla (II.1) afectades de migranya amb aura visual. Els pacients pertanyen a una família autosòmica dominant en què segreguen fenotips més greus de la malaltia (MA visual i sensitiva i FHM) que no són portadors del canvi (veure figura 1 de l'article 4, pàgina 209). La mutació és una substitució aminoacídica, p.Ala454Thr, situada en el llaç intracel·lular que uneix els dominis DI i DII de la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$. Les anàlisis funcionals revelen que aquest canvi afecta la regulació de la inactivació dependent de voltatge de l'estat de repòs per part de les subunitats $Ca_v\beta$, accelera la inhibició provocada pel dímer $\beta\gamma$ de la proteïna G després d'una despolarització facilitadora, i evita la interacció de la sintaxina1A amb la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ anul·lant els efectes de la seva modulació i disminuint, per tant, l'eficàcia en la secreció de neurotransmissor. En aquest treball es planteja per primer cop que una mutació en el gen *CACNA1A* pugui actuar com a modulador del fenotip i no com a causant de la malaltia.

Exclusió de loci prèviament relacionats amb la migranya i identificació del canvi p.Ala454Thr al gen CACNA1A

L'anàlisi haplotípica dels loci *CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* i *SLC1A3* en aquesta família va descartar els gens *SCN1A* i *SLC1A3* com a responsables de la malaltia perquè no tots els individus FHM presentaven la mateixa combinació d'al·lels al voltant del gen, i situava el gen *ATP1A2* com a principal candidat d'entre els gens analitzats, ja que tots els individus afectats

d'algun tipus de migranya compartien el mateix haplotip. No obstant, una anàlisi mutacional exhaustiva de la regió codificant i de les regions intròniques flanquejants no va revelar canvis potencialment patogènics en aquest gen. En el cas del gen *CACNA1A*, cinc dels sis descendents afectats de l'individu I.2, membre de la parella fundadora d'aquesta genealogia, són portadors del mateix haplotip al voltant del gen, raó per la qual es va decidir també fer una anàlisi mutacional de les regions codificants en els individus II.1 i II.5. De l'anàlisi va resultar un únic canvi, p.Ala454Thr, present a l'individu II.1 (migranya amb aura visual) i no en el II.5 (FHM). L'estudi de la presència d'aquesta mutació a la resta d'individus disponibles de la família va detectar, com era d'esperar a partir de l'anàlisi haplotípica, un únic individu addicional portador del canvi, l'I.2 (com el II.1, amb migranya amb aura visual). La mutació és absent en els 5 individus restants afectats de variants de migranya, la qual cosa descarta la mutació p.Ala454Thr com a responsable del fenotip migranyós hemiplègic en aquesta família. Aquest canvi, a més, havia estat prèviament descrit com a polimorfisme en detectar-se amb una freqüència de 0,02 en una petita mostra de població general (Ophoff et al., 1996), però nosaltres no l'hem detectat en un cribratge de 300 cromosomes d'individus espanyols no migranyosos. Recentment, el canvi s'ha associat a un pacient amb atàxia cerebel·losa progressiva (PCA) (Cricchi et al., 2007). Els individus I.2 i II.1, portadors del canvi, no presenten cap símptoma de PCA i només es diferencien de la resta d'individus afectats de la família en que tenen un fenotip més lleu de l'aura de migranya, que cursa amb absència de símptomes sensitius i motors.

La mutació p.Ala454Thr implica la substitució d'un aminoàcid no polar (Ala), per un aminoàcid polar no carregat (Thr), a la nansa citoplasmàtica situada entre els dominis DI i DII de la proteïna *CACNA1A*, molt a prop de la regió d'interacció amb la subunitat β reguladora del canal i molt a prop també del lloc d'unió al dímer $\beta\gamma$ de la proteïna G, que regula la cinètica d'inactivació del canal. A més, és probable que aquesta nansa funcioni com a "tapa" del porus format pels quatre dominis de la subunitat $\alpha 1A$ (Stotz i Zamponi, 2001). L'alanina 454 està conservada a nivell intraespecífic (subunitats *CACNA1B* i *E*) i interespecífic (subunitats $\alpha 1A$ de l'home –*Homo sapiens*-, la vaca– *Bos taurus* -, el ratolí –*Mus musculus*-, la rata –*Rattus norvegicus*-, i el conill –*Oryctolagus cuniculus*-), tot indicant que aquest residu tindria una rellevància estructural i/o funcional a la proteïna.

Implicacions funcionals del canvi p.Ala454Thr

En el marc d'aquesta Tesi es va iniciar fa uns anys una col·laboració amb el grup dirigit pel Dr. Valverde al Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties de la UPF per dur a terme estudis funcionals de les mutacions identificades al gen *CACNA1A* en els pacients. Tot i que el nostre grup ha contribuït als estudis funcionals només en la fase inicial, amb la preparació de les construccions genètiques utilitzades posteriorment per l'equip de la UPF en diversos experiments de transfecció i electrofisiologia, s'ha considerat interessant incloure a la Discussió alguns comentaris sobre aquesta part del treball:

El procés d'inactivació del canal, que s'observa en gairebé totes les mutacions causants de FHM que s'han estudiat a nivell funcional, està modulats per interaccions entre la subunitat α del canal i altres subunitats auxiliars i proteïnes externes al canal.

Els llocs d'interacció de la subunitat α a proteïnes intracel·lulars i altres subunitats auxiliars del canal que regulen la subunitat α , implica els llaços intracel·lulars entre dominis. La regulació afecta el procés d'inactivació del canal en gairebé totes les mutacions causants de FHM estudiades. Una mutació situada en aquests dominis podria tenir per tant, conseqüències en el procés d'inactivació dels canals de calci. La mutació p.Ala454Thr està localitzada en el primer llaç intracel·lular entre els dominis I i II, molt propera al domini d'interacció de la subunitat α (seqüència AID, de 18 aminoàcids) a les subunitats $\text{Ca}_v\beta$ (seqüència BID, de 41 aminoàcids). El paper que juga la subunitat $\text{Ca}_v\beta$ en la regulació de la inactivació del canal, és fonamental en la regulació mediada per subunitats auxiliars.

La inactivació del canal mediada per les subunitats β , és diferent en funció del tipus de subunitat β associada al canal, de forma que, la subunitat β_2 incrementa l'activitat del canal portant la seva inactivació cap a voltatges més positius, i la subunitat β_3 disminueix l'activitat del canal tenint efectes oposats sobre la inactivació dependent de voltatge de l'estat de repòs, portant la inactivació del canal cap a voltatges més negatius. Totes les subunitats $\text{Ca}_v\beta$ excepte la $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, acceleren la inactivació del canal i hiperpolaritzen la inactivació voltatge-dependent del potencial de repòs. La subunitat $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, té l'efecte oposat.

Quan es compara l'efecte de la $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ sobre el canal salvatge vs el mutat, el voltatge al qual el 50% dels canals estan inactivats es desplaça en uns 6mV cap a potencials més negatius en el canal mutat, i en canvi en el cas de la $\text{Ca}_v\beta_3$, el desplaçament es també d'uns 6mV, però aquest cop cap a potencials més positius en el canal mutat, tot suggerint que el canal mutat ha perdut part de la regulació mitjançada per les subunitats beta. Aquesta mutació comportarà

guany de funció de canal quan aquest estigui associat a la subunitat $Ca_v\beta_{3r}$, i pèrdua de funció quan estigui associat a la subunitat $Ca_v\beta_{2A}$. La implicació fisiològica d'aquesta mutació quant a la regulació per subunitats beta és difícil de predir, ja que aquestes s'expressen de manera diferencial segons el tipus de neurones i fins i tot segons el compartiment cel·lular d'una mateixa neurona. La resta de cinètiques d'inactivació dependents de voltatge que no afecten l'estat de repòs no es veuen alterades, reflectint que els efectes observats no es deuen a una alteració en la unió de la subunitat $Ca_v\alpha$ a la subunitat $Ca_v\beta$.

Una altre mecanisme molt important en la regulació de la inactivació del canal que podria veure's afectat per la mutació p.Ala454Thr és la regulació mitjançada pels dímers $\beta\gamma$ de la proteïna G. Aquesta proteïna, formada per tres subunitats, està unida a receptors transmembrana presinàptics, i sota estimulació del receptor, s'allibera el dímer $\beta\gamma$ que s'uneix a la seqüència QXXER que es troba situada dintre del domini d'interacció α (AID) a on s'unien les subunitats reguladores $Ca_v\beta$. Aquesta unió produeix la inhibició voltatge-dependent dels canals de tipus P/Q, mitjançant la dissociació dels dímers quan el canal experimenta canvis conformacionals en resposta a la despolarització, i la reassociació d'aquests dímers a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$, quan els canals pateixen canvis en resposta a la hiperpolarització.

Els estudis en el canal mutat mostren que després d'una despolarització facilitadora es produeix una acceleració en la cinètica de reinhibició del canal, que es tradueix en una taxa alterada d'associació dels dímers $\beta\gamma$ de la proteïna G a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$. Com que l'associació es dona durant la repolarització de la membrana, es podria pensar que la mutació p.Ala454Thr només augmenta l'afinitat de la unió entre els dímers $\beta\gamma$ de la proteïna G i la subunitat $Ca_v\alpha$ a voltatges hiperpolaritzats. La taxa de dissociació del dímers $\beta\gamma$ de la proteïna G a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ no queda alterada.

L'estimulació dels receptors de proteïna G durant i després d'una alta freqüència de trens de potencials d'acció augmentaria la inhibició del canal per unió dels dímers $\beta\gamma$ de la proteïna G a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ disminuint així la capacitat dels canals portadors de la mutació p.Ala454Thr, d'activar l'afluència de Ca^{2+} a les sinapsis més actives.

Per últim, s'ha demostrat que la mutació p.Ala454Thr interrompt la interacció de la syntaxina 1A a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$. La syntaxina 1A forma part de les proteïnes SNARE, que s'uneixen al llaç intracel·lular que uneix els dominis DII i DIII de la proteïna, en una regió anomenada synprint (de "*synaptic protein interaction*"). Se suggereix que en el plegament de la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ per a formar el canal, els llaços intracel·lulars que hi ha entre els diferents dominis i

també els extrems N i C terminals, quedarien físicament molt propers, de manera que els canvis situats en un dels llaços poden afectar les interaccions dels altres llaços i els extrems N i C terminals. Les vesícules SNARE tenen una doble funció sobre el canal salvatge: 1) intervenen en l'acoblament físic de les vesícules alliberadores de neurotransmissors a la membrana presinàptica prop de la via d'entrada de calci, que és el senyal que desencadena l'alliberament excitòtic de neurotransmissors i 2) en resposta a trens de polsos curts de potencials d'acció inhibeixen els canals mitjançant un canvi cap a potencials de membrana més negatius, en la dependència del voltatge de l'estat de repòs.

Com que la mutació p.Ala454Thr impedeix la unió de la syntaxina 1A a la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$, l'eficàcia en la secreció de neurotransmissor a l'espai sinàptic queda disminuïda.

Aquesta és la primera vegada que una mutació espontània identificada en un pacient afecta una de les especialitzacions més importants del canals $Ca_v2.1$, que és la capacitat d'interaccionar amb les proteïnes presinàptiques SNARE. Aquests resultats també mostren per primera vegada la importància del llaç que uneix els dominis I i II, lloc d'unió de la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ a proteïnes del complex SNARE, les quals tenen la funció de mantenir una transmissió sinàptica òptima.

Resumint, dels experiments funcionals podem concloure que la mutació p.Ala454Thr produeix canvis rellevants en la fisiologia molecular del canal portador per desregulació de tres mecanismes essencials:

- 1) Provoca canvis en la inactivació de l'estat de repòs dependent de voltatge i accelera la recuperació de la inhibició mitjançada pel dímer de proteïna $G\beta\gamma$. Aquests canvis tenen importància funcional durant i després d'una alta freqüència de descàrregues neuronals, situació que es dona durant la depressió cortical propagant (CSD) en pacients migranyosos. L'impacte de la mutació dependrà, com hem vist en aquest treball i l'estudi en altres mutacions anteriorment descrites (Mullner et al., 2004), del tipus de subunitat $Ca_v\beta$ associada al canal.
- 2) La manca d'interacció entre la syntaxina 1A i el canal portador de la mutació p.Ala454Thr dona com a resultat una disminució de la secreció de vesícules amb neurotransmissor acoblades a canals $Ca_v2.1$, i impliquen el llaç d'unió entre els dominis I i II com a part integrant dels mecanismes reguladors que inclouen les proteïnes SNARE. Aquesta disminució en la funció del canal podria elevar el llindar per al desencadenament de la CSD, principalment a les àrees corticals sensorio-motors on l'inici de la CSD requereix un estímul excitador més gran

que a l'àrea visual occipital. Això podria explicar el fenotip diferencial dels individus portadors de la mutació respecte a la resta de familiars afectats de migranya amb aura més greu. A més, com les mutacions al gen *CACNA1A* associades a atàxia impliquen, en línies generals, pèrdua de funció (a diferència de les mutacions que causen FHM), la reducció en l'eficàcia de la secreció de transmissors també explicaria el desenvolupament de símptomes cerebel·losos que s'han associat a aquesta mutació en un treball recent (Cricchi et al., 2007).

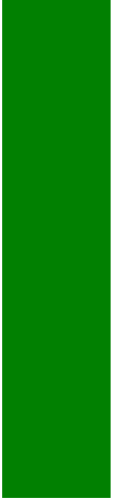
3) El comportament d'aquesta mutació en neurones que expressen el canal nadiu així com la confirmació dels efectes potencials d'aquesta mutació en la prevenció de l'aura sensitivo-motora és essencial per considerar el gen *CACNA1A* no només un possible causant de la patologia migranyosa sinó també un gen que pot actuar com a modificador del fenotip.

C. CONSIDERACIONS FINALS

L'estudi de les formes monogèniques de migranya, a més de diverses complicacions que ja s'han anat comentant, com l'heterogeneïtat genètica, la variabilitat en l'expressió clínica, la penetració incompleta, les fenocòpies i les genocòpies i l'efecte dels factors ambientals, topa amb altres dificultats com ara: 1) el seu caràcter episòdic i la manca de marcadors biològics tant en fase aguda com en període intercrític, que obliguen a un diagnòstic basat en el testimoni del pacient normalment fora de l'episodi i que dificulten la identificació de la malaltia en l'edat pediàtrica 2) la variabilitat de la simptomatologia en funció de l'edat de l'individu; així p.ex., els criteris diagnòstics estan funció del número d'episodis soferts al llarg de la vida, de manera que un individu pot canviar de l'estat sa al d'afectat, o afegir noves categories al seu diagnòstic a mesura que envellaix, 3) l'agrupació de pacients en categories fenotípicament homogènies i delimitades que podrien correspondre des del punt de vista genètic, a entitats heterogènies, 4) la difícil obtenció del teixit d'interès –sistema nerviós central- i l'escàs coneixement sobre el seu funcionament que complica la interpretació dels resultats i 5) la dificultat d'interpretar una simptomatologia basada en el testimoni del pacient, en animals d'experimentació.

Els estudis de lligament que es presenten en aquest treball proporcionen evidències significatives de l'existència d'un nou *locus* comú a FHM i MA en dues famílies

catalanes. La identificació d'un nou *locus* de migranya i els resultats de l'anàlisi mutacional realitzada en el gen *CACNA1A* augmenten la reconeguda heterogeneïtat genètica no al·lèlica i al·lèlica de les formes monogèniques rares de migranya. Identificar el nou gen de migranya que hem localitzat al cromosoma 14 i estudiar la seva rellevància entre els pacients migranyosos a nivell espanyol i mundial contribuirà de ben segur a una millor comprensió dels mecanismes moleculars de la migranya i també a la identificació de possibles dianes terapèutiques en benefici dels pacients que la pateixen.





CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

- I. Mitjançant anàlisi de lligament a nivell genòmic amb SNPs en una única família extensa d'herència autosòmica dominant, s'ha identificat un nou *locus* de migranya hemiplègica familiar (FHM) en una regió de 4,15 Mb al cromosoma 14q32.12-32.13. Aquesta troballa accentua encara més la ja coneguda heterogeneïtat genètica d'aquesta variant monogènica de migranya. L'haplotip que cosegrega amb la FHM en tots els individus afectats conté 47 gens candidats posicionals, quatre dels quals s'han considerat bons candidats funcionals. No s'ha identificat cap variant potencialment patogènica al gen *SLC24A4*, que codifica un intercanviador de sodi/potassi/calci.

- II. Mitjançant un segon cribratge genòmic en una família també autosòmica dominant utilitzant marcadors de tipus microsatèl·lit, s'ha identificat un possible *locus* de migranya amb aura no hemiplègica (MA) en una regió de 19,45Mb al cromosoma 14q24.3-q34.2. Aquesta regió conté el *locus* 14q32.12-32.13 identificat per nosaltres a la família FHM, tot suggerint que la causa genètica d'ambdues variants de migranya és la mateixa a les dues famílies.

- III. En pacients espanyols amb FHM, el cribratge mutacional del gen *CACNA1A*, que codifica la subunitat α_{1a} del canal de calci neuronal de tipus P/Q, ha permès la identificació de dues noves mutacions, p.Val581Met i p.Tyr1245Cys, i una mutació prèviament descrita, p.Cys1534Ser. Això equival a un percentatge del 27,3% de mutacions identificades al gen *CACNA1A* en els pacients espanyols amb FHM analitzats, tot suggerint que la FHM és genèticament més heterogènia del que s'havia descrit fins ara. En el mateix grup de pacients no s'ha identificat cap mutació en els gens *ATP1A2* i *SCN1A*.

- IV. La mutació p.Tyr1245Cys en el gen *CACNA1A* és la primera descrita en un pacient amb torticoli paroxíctic benigne del lactant (BPT). La troballa reforça la hipòtesi clínica que postula que BPT constitueix un quadre clínic precursor de migranya (CPS).

- V. En pacients espanyols amb atàxia episòdica de tipus 2 (EA2), el cribratge mutacional del gen *CACNA1A* ha permès identificar dues noves mutacions, p.Thr501Met i p.Gly638Asp, una mutació prèviament descrita, p.Arg583Gln, i una mutació anteriorment descrita com a polimorfisme, p.Pro1011Ala. Això equival a un percentatge de mutacions inferior al 15% en els pacients analitzats i suggereix que alteracions en el gen *CACNA1A* no són les responsables principals del fenotip EA2. En canvi, el 100% dels pacients amb el fenotip compost EA2/MA presenten mutacions en el gen *CACNA1A*.
- VI. S'ha identificat la nova mutació p.Pro1138Ala en el gen *CACNA1A* en una pacient amb hipotèrmia essencial episòdica amb hiperhidrosi. Malgrat que encara no s'ha confirmat la patogenicitat de la mutació mitjançant estudis funcionals, els antecedents familiars del cas índex i l'evolució clínica d'altres casos publicats prèviament, suggereixen que la hipotèrmia episòdica pot representar una forma de canalopatia infantil, presumiblement relacionada amb la migranya com a síndrome periòdica de la infància (CPS).
- VII. S'ha identificat la mutació p.Ala454Thr en el gen *CACNA1A* en dos individus amb MA d'una família afectada de FHM i MA. Aquesta mutació altera la regulació de la inactivació dependent de voltatge de l'estat de repòs per part de les subunitats $Ca_v\beta$ del canal, accelera la inhibició provocada pel dímer $\beta\gamma$ de la proteïna G després d'una despolarització facilitadora, i evita la interacció de la sintaxina 1A amb la subunitat $Ca_v\alpha_{1a}$ anul·lant els efectes de la seva modulació i disminuint l'eficàcia en la secreció de neurotransmissor per la neurona. La presència de la mutació només en els individus de la família que no tenen símptomes sensitivo-motors, suggereix que algunes alteracions en el gen *CACNA1A* poden estar implicades no en el desencadenament del fenotip migranyós, sinó en la seva modulació.