



Universiteit  
Leiden

The Netherlands

## Unravelling the mystery of migraine and cluster headache: insights into the genetics and biochemistry of these neurological disorders

Harder, A.V.E.

### Citation

Harder, A. V. E. (2023, November 21). *Unravelling the mystery of migraine and cluster headache: insights into the genetics and biochemistry of these neurological disorders*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3663594>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3663594>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# Nederlandse Samenvatting

Dit proefschrift onderzoekt welke biochemische en genetische veranderingen geassocieerd zijn met migraine en clusterhoofdpijn. Dit onderzoek heeft als doel om de kennis over de pathofysiologie en de signaalroutes die betrokken zijn bij migraine en clusterhoofdpijn te vergroten en daardoor nieuwe aangrijpingspunten voor behandeling te identificeren. Door te onderzoeken hoe patiënten verschillen van mensen zonder de ziekte worden de bijdragende biologische mechanismen blootgelegd, dit leidt vervolgens tot een nieuw begrip van de pathofysiologie van hoofdpijnaandoeningen. De biologische systemen in ons lichaam zijn allemaal aan elkaar gerelateerd, ze verhouden zich tot elkaar vanaf de genomische blauwdruk via epigenetica, transcriptie en translatie tot aan de eiwitten en biomoleculen. Door deze verschillende moleculaire niveaus te onderzoeken hopen we een beter inzicht te krijgen in de werking van hoofdpijnaandoeningen. Dit proefschrift bestaat uit twee delen: **Deel 1, (hoofdstukken 2 t/m 5)** is gericht op het onderzoek van biomoleculen in lichaamsvloeistoffen (bloed en hersenvocht) bij migrainepatiënten; en **Deel 2, (hoofdstuk 6 t/m 9)** gericht is op de genetische architectuur van clusterhoofdpijn, migraine en aanverwante aandoeningen.

## Deel I Biochemie van migraine

**Deel 1** beschrijft biochemische studies waarbij verschillende moleculen en metaboliëten werden gemeten bij mensen met migraine en vergeleken met mensen zonder migraine. Migraine is een hoofdpijnaandoening die wordt gekenmerkt door terugkerende episoden van ernstige, vaak eenzijdig pulserende hoofdpijn die gepaard gaat met misselijkheid, braken en/of foto- en fonofobie. Bij een derde van de patiënten worden de aanvallen voorafgegaan door een aurafase. Typisch bestaat een migraineaanval uit een preictale, ictale (aura en/of hoofdpijn), en postictale (postdromale) fase. Hoewel in de loop der jaren veel vooruitgang is geboekt bij het begrijpen van de pathofysiologische mechanismen die betrokken zijn bij migraine, is het nog steeds onduidelijk waarom sommige mensen migraine krijgen en anderen niet en waarom degenen met migraine op bepaalde momenten aanvallen krijgen en welke factoren de aanvallen uitlokken. Het doel van **deel 1** was het verder identificeren van de biochemische werking van migraine om de betrokken signaalroutes te kunnen identificeren. De onderzoeken richtten zich op het meten van een groot aantal verschillende biomoleculen, hetzij via een hypothese-gerichte, hetzij via een hypothese-vrije aanpak. De studies waren gericht op zowel bloed als hersenvocht en daarnaast is onderzocht in hoeverre beide lichaamsvloeistoffen vergelijkbaar zijn met betrekking tot amineconcentraties. We onderzochten in op één na alle hoofdstukken (**hoofdstuk 2,3 en 4**) deze lichaamsvloeistoffen buiten een aanval en in één hoofdstuk in de loop van een uitgelokte migraineaanval. Op die manier werden verschillende aspecten van migraine onderzocht.

In **hoofdstuk 2** wordt het metabole profiel van migrainepatiënten vergeleken met dat van patiënten zonder migraine in een hypothese-vrije aanpak met “high-throughout” proton

nucleaire magnetische resonantie (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopie. In totaal werden 100 signalen van 49 verschillende metabolieten van 189 migrainepatiënten en 1.360 controles in nuchtere serummonsters gedetecteerd. De migrainestatus werd onderverdeeld in “lifetime” migraine (migrainediagnose tijdens het leven) en actieve migraine (gedefinieerd als ten minste één ernstige migraine aanval in de afgelopen 12 maanden). Met behulp van “elastic net regression” analyses werden voorspellende profielen geïdentificeerd voor “lifetime” migrainestatus bestaande uit 6 metabolieten en voor actieve migrainestatus bestaande uit 22 metabolieten. Deze voorspellende metabolieten omvatten lipiden, aminozuren en metabolieten van het glucosemetabolisme. Deze resultaten wijzen op een algemene verstoring van het metabole profiel bij migrainepatiënten.

In **hoofdstuk 3** werd de relatie in aminegehalten tussen bloedplasma en hersenvocht bepaald. Hersenvocht is een lichaamsvloeistof die bij uitstek veel kan vertellen over aandoeningen van het centrale zenuwstelsel, zoals migraine, omdat deze vloeistof het dichtst bij de hersenen ligt en daarmee het best de neurochemie van de hersenen weerspiegelt aan de hand van de metabolieten niveaus die aanwezig zijn. Bloedmetingen verdienen de voorkeur om de biochemische aspecten van een ziekte te beoordelen, omdat een lumbaalpunctie (ter verkrijging van hersenvocht) een invasieve en ingrijpende methode is, daarbij is het niet altijd haalbaar of ethisch verantwoord om deze uit te voeren. Om te bepalen of het mogelijk is om bloed te gebruiken voor aminemetingen in plaats van hersenvloeistof is het van essentieel belang om te bepalen of de aminegehalten in bloed representatief zijn voor de aminegehalten in hersenvocht. Daarom werden de aminegehalten in het bloed vergeleken met die in het hersenvocht van 95 gezonde mensen. De resultaten lieten zien dat de amineconcentraties in plasma niet direct correleerden met de amineconcentraties in het hersenvocht. Dit betekent dat de plasmaconcentraties voor de meeste aminen slechte voorspellers zijn van de hersenvochtconcentraties, wanneer zij als directe correlaties worden bestudeerd ( $\frac{\text{Amine } x_{\text{bloed}}}{\text{Amine } y_{\text{hersenvocht}}} = r$ ). Bij bestudering als ratio's (d.w.z.  $\frac{\text{Amine } x_{\text{bloed}} / \text{Amine } y_{\text{bloed}}}{\text{Amine } x_{\text{hersenvocht}} / \text{Amine } y_{\text{hersenvocht}}} = r$ ) was er echter een significante correlatie tussen bloed en hersenvocht. Voor 308 van de 741 aminecombinaties waren de ratio correlaties significant hoger dan de gerelateerde enkelvoudige metaboliet correlatie. Dit wijst erop dat het gebruik van ratiocorrelaties een betere methode is om de amineconcentratie in het bloed te vergelijken met die in het hersenvocht. Bovendien impliceren deze resultaten dat de ratio's tussen bloed en hersenvocht strak gereguleerd worden door de transportsystemen van de bloed-hersenbarrière, hetgeen waarschijnlijk wijst op het co-transport van amines. Als “proof-of-concept” werden de amineratio's in 95 gezonde controles vergeleken met die in 197 migrainepatiënten en werden significante verschillen gezien tussen de twee groepen, hetgeen suggereert dat amines een rol spelen in de pathofysiologie van migraine.

In **hoofdstuk 4** werden biochemische veranderingen in endocannabinoïden niveaus van migrainepatiënten in bloedplasma buiten een aanval onderzocht. Het endocannabinoïde systeem is een interessant onderwerp voor onderzoek naar migraine, omdat bekend is dat het een sterke invloed heeft op neurotransmissie, het neuro-immuunsysteem en het neuro-endocriene systeem, en al die systemen zijn ook betrokken bij de pathofysiologie van migraine. Een ander interessant aspect is de

rol die het endocannabinoïde systeem speelt bij depressie, een bekende comorbiditeit van migraine. Meerdere klinische studies hebben een ontregeling van het endocannabinoïde systeem vastgesteld bij patiënten met ernstige depressieve stoornissen. Verschillende eerdere studies onderzochten de endocannabinoïden niveaus bij migrainepatiënten, maar de resultaten waren inconsistent. In onze studie werden in 94 gezonde vrijwilligers en 97 migraine met aura en 97 migraine zonder aura patiënten de niveaus van endocannabinoïden anandamide (AEA) en 2-arachidonoylglycerol (2-AG), en het endocannabinoïde-analoog docosahexaenylethanolamine (DHEA) buiten een aanval betrouwbaar gemeten in hersenvocht. De endocannabinoïde concentraties werden gemeten via eerder gevalideerde microvloeistofchromatografie - tandem massaspectrometrie (micro-LC-MS/MS). Gezien het aantal mogelijke confounders op de endocannabinoïde concentraties, werden de timing en verwerking van de monsters strikt geprotocolleerd en werd onze analyse gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, BMI, wekelijks alcoholgebruik, sigaretten per dag en “lifetime” depressie. Er werden geen verschillen gevonden in endocannabinoïde niveaus tussen migraine patiënten en controles. Verschillende van de mogelijke confounders (geslacht, roken, leeftijd en BMI, en “lifetime” depressie) hadden wel een significant effect op de endocannabinoïde spiegels. Het meest opvallend was het effect van depressie op endocannabinoïde concentraties, aangezien depressie een comorbiditeit van migraine is. Deze studie is illustratief voor de complexiteit van het endocannabinoïde systeem, waarbij het belangrijk is gebleken rekening te houden met de rol van confounders op endocannabinoiden concentraties.

In **hoofdstuk 5** werd de rol van prostaglandine- $E_2$  ( $PGE_2$ ) in relatie tot een uitgelokte migraineaanval onderzocht. Er is gebleken dat intraveneuze toediening van  $PGE_2$  een migraine -achtige hoofdpijn aanval kan uitlokken. Toediening van  $PGE_2$  veroorzaakt een zeer snel begin van een aanval namelijk binnen een uur, in tegenstelling tot andere provocerende stoffen, zoals glyceryltrinitraat (GTN), calcitonine-geen-gerelateerd peptide (calcitonin-gene-related peptide; CGRP), die een migraineaanval pas na enkele uren uitlokken. Het feit dat  $PGE_2$  zo'n snelle aanval veroorzaakt, suggereert dat  $PGE_2$  een laat signaal eiwit kan zijn in de signaal route naar een migraineaanval, zodanig dat  $PGE_2$  nauw betrokken kan zijn bij GTN-geïnduceerde migraineaanvallen. Om de rol van  $PGE_2$  in de aanloop naar een aanval betrouwbaar te onderzoeken, werden bloedmonsters van 37 vrouwen met migraine en 25 op leeftijd “gematchte” vrouwelijke controles verkregen op drie tijdstipmomenten, namelijk (1) vóór provocatie met GTN en (2) ~140 min en (3) ~320 min na provocatie met GTN. Na analyse met een “generalized mixed-effect model”, werden geen verschillen gevonden in  $PGE_2$ -niveaus tussen de interictale en de preictale toestand, noch tussen de interictale en de ictale toestand. Dit betekent dat er geen bewijs is dat een stijging van  $PGE_2$  essentieel is voor het ontstaan van door GTN geïnduceerde migraine aanvallen.

## **Deel II Genetica van verschillende vormen van hoofdpijn**

Het doel van **deel 2** was de genetische architectuur van meerdere hoofdpijnaandoeningen te onderzoeken. Naast migraine hebben we ook gekeken naar de genetische architectuur van



clusterhoofdpijn en hemiplegische migraine. Clusterhoofdpijn wordt gekenmerkt door ondraaglijke eenzijdige hoofdpijn of aangezichtspijn die gepaard gaat met ipsilaterale craniale autonome verschijnselen en/of rusteloosheid. Hemiplegische migraine is een subtype van migraine met aura, waarbij de aurfase gepaard gaat met motorische zwakte die kan overgaan in hemiplegie. In de meeste hoofdstukken (**hoofdstukken 6,7, en 8**) van **deel 2** werden genomwijde associatiestudies (genome-wide association studies; GWAS) gebruikt om het verschil in genetische architectuur tussen patiënten en controles te onderzoeken. In GWAS worden miljoenen “single nucleotide polymorfismen” (SNPs) getest op associatie met een aandoening door verschillen in allelfrequenties tussen grote aantallen patiënten en controles te vergelijken. Daarnaast hebben we in **hoofdstuk 9** een next generation sequencing aanpak gebruikt waarbij het hele exoom werd gesequenced en keken wij gericht naar verschillen tussen hemiplegische migrainepatiënten en controles.

In **hoofdstuk 6** was het doel om genetische risico loci voor clusterhoofdpijn te identificeren. Hiervoor werd het DNA van 840 clusterhoofdpijnpatiënten en 1.457 controles gegenotypeerd, op kwaliteit gecontroleerd en geïmputeerd en met elkaar vergeleken met een logistisch regressiemodel. Voor vier onafhankelijke loci rs11579212 (nabij *RP11-815M8.1*), rs6541998 (nabij *MERTK*), rs10184573 (nabij *AC093590.1*), en rs2499799 (nabij *UFL1/FHL5*) werd een associatie met clusterhoofdpijn gevonden, deze loci verklaarden gezamenlijk 7,2% van de variantie van het clusterhoofdpijn fenotype. De resultaten van drie van de vier loci werden gerepliceerd in een onafhankelijk Noors cohort bestaande uit 144 clusterhoofdpijn patiënten en 1800 controles. In tegenstelling tot wat gewoonlijk wordt gevonden in GWAS, werden in onze studie zeer grote effectgroottes gevonden (alle met een odds ratio van >1,2), wat erop wijst dat het risico voor clusterhoofdpijn mogelijk wordt bepaald door een beperkt aantal risico loci. Daarnaast werd het effect van deze vier risico loci op de expressie van genen onderzocht, dit leverde 16 genen op die betrokken lijken te zijn bij de pathofysiologie van deze ziekte. De expressie van deze genen werd onderzocht in een eerder uitgevoerde RNA-sequencing dataset, waarbij een verandering in expressie van *POLR1B* en *TMEM87B* in clusterhoofdpijn patiënten werd gevonden. In een aparte correlatieanalyse werden aanwijzingen gevonden voor een genetische overlap van clusterhoofdpijn met migraine. Op hetzelfde moment werd in een Brits-Zweeds cohort ook een GWAS uitgevoerd bij clusterhoofdpijnpatiënten op basis van 852 Britse clusterhoofdpijn patiënten en 5.614 controles en 591 Zweedse clusterhoofdpijn patiënten en 1.134 controles. Deze parallelle studie vond vier loci die in linkage disequilibrium waren met onze loci. Dit ondersteunt de bevinding dat deze loci ook daadwerkelijk risico loci voor clusterhoofdpijn zijn. Data van onze studie werden gecombineerd met de Brits-Zweedse data in een meta-analyse in een post-scriptum. Deze meta-analyse resulteerde in drie additionele genombrede significante risico loci.

**Hoofdstuk 7** is een verdere uitbreiding van de meta-analyse van clusterhoofdpijn uit **hoofdstuk 6**. In **hoofdstuk 7** zijn de genetische data van de twee eerdere studies (Nederland/Noorwegen en V-K/Zweden) samen met een andere eerder gepubliceerde Italiaanse GWAS-studie en vijf nieuwe Europese cohorten samen geanalyseerd. In het totaal werd een meta-analyse uitgevoerd op 4.043

clusterhoofdpijn patiënten en 21.729 controles uit tien cohorten allen van Europese achtergrond. Zeven genoombrede significante loci werden geïdentificeerd, waarvan drie nieuwe rs2402176 (*WNT2*), rs57866767 (*PLCE1*) en rs11172113 (*LRP1*) en vier eerder geïdentificeerde rs17011182, (*DUSP10*), rs13399108 (*MERTK*), rs6714578 (*FTCDNL1*) en rs9486725 (*FHL5*). Downstream bio-informatica analyses toonde een verrijking voor slagader- en hersenweefsel aan. Verder werden correlatieanalyses uitgevoerd, waaruit een genetische overlap bleek van clusterhoofdpijn met migraine, roken, risicogedrag, ADHD, depressie en pijn aan het bewegingsapparaat. Een additionele analyse naar overlap met migraine toonde aan dat clusterhoofdpijn en migraine drie genetische risico loci delen. Dit suggereert dat de twee aandoeningen genetisch deels hetzelfde en deels verschillend zijn. Verder werd het mogelijke causale verband van roken op clusterhoofdpijn onderzocht met een “two-sample” Mendeliaanse randomisatie analyse. Deze analyse liet een causaal effect van de intensiteit van roken op clusterhoofdpijn zien. Dit effect van roken op clusterhoofdpijn heeft mogelijke klinische implicaties. In een secundaire “trans-ancestry” meta-analyse voegden we 734 gevallen en 9.846 controles van Oost-Aziatische afkomst toe aan onze meta-analyse. Eén extra genoombreed significant cluster hoofdpijn locus, in *CAPN2*, werd geïdentificeerd bij het toevoegen van het Oost-Aziatische cohort in een voor afkomst gecorrigeerde GWAS meta-analyse.

Over de jaren zijn steeds meer genetische risico loci voor migraine vanuit verschillende studies gerapporteerd op basis van steeds grotere aantal patiënten dat word meegenomen. In **hoofdstuk 8** werd de studie omvang verder uitgebreid tot 102.084 migraine patiënten en 771.257 controles van verschillende internationale cohorten allen met een Europese achtergrond. Daarnaast werd de specificiteit van de migraine subtypes onderzocht bij klinisch gediagnosticeerde patiënten in 14.625 patiënten met migraine met aura en 15.055 patiënten met migraine zonder aura. De meta-analyse identificeerde 123 risico loci, waarvan 86 nieuwe ten opzichte van eerdere studies. Opmerkelijk is dat de nieuwe risico loci locaties omvatten die corresponderen met genen die calcitonine generelateerd peptide (*CALCA/CALCB*) en serotonine 1F receptor (*HTR1F*) transcriberen. Dit zijn bekende aangrijpingspunten voor migrainemedicatie. Deze bevinding toont duidelijk aan dat GWASen de mogelijkheid hebben om (nieuwe) doelwitten voor behandeling te identificeren. Downstream-analyse op basis van deze meta-analyse bevestigde nogmaals dat neurovasculaire mechanismen ten grondslag liggen aan de pathofysiologie van migraine, aangezien er een verrijking was voor vaatweefsel en weefsel van het centrale zenuwstelsel op basis van de risico loci. In de subtype-analyse werden verschillende risico loci gevonden voor migraine met en zonder aura, en risico loci die correspondeerden met beide subtypen. Opmerkelijk is dat *CACNA1A*, een bekend hemiplegische migraine gen, werd geïdentificeerd als één van de risico loci voor migraine met aura, op basis hiervan kunnen zowel monogene als polygene vormen van migraine met elkaar in verband worden gebracht.

In het verlengde van de koppeling van zowel monogene als polygene vormen van migraine, werd in **hoofdstuk 9** verder onderzocht welke genetische factoren bijdragen aan hemiplegische migraine. Dit werd onderzocht in hemiplegische migrainepatiënten bij wie geen mutatie werd aangetoond in *CACNA1A*, *ATP1A2* en *SCN1A*. Gezien de eerdere associatie met *CACNA1A* in **hoofdstuk 8** en andere associaties van migraine met *CACNA1B*, *CACNA1E* en *CACNA1H* in andere studies, is de familie van *CACNA1x*-genen een interessant onderwerp voor “burden” onderzoek (“burden” is de aggregatie van zowel zeldzame als veel voorkomende genetische varianten, en het frequenter voorkomen van een variant in patiënten in vergelijking met controles). In totaal werd van 184 Australische hemiplegische migrainepatiënten het exoom gesequenced. De subject- en variant “burden” van “missense”-varianten in de *CACNA1x*-genen van deze hemiplegische migrainepatiënten werd vergeleken met controles uit gnomAD. Er werd een toename in “burden” gevonden in *CACNA1H*-genen en *CACNA1I*-genen, dit werd gerepliceerd in een onafhankelijk Nederlands cohort bestaande uit 32 patiënten met hemiplegische migraine. Uit deze studie kan worden geconcludeerd dat een “burden” van (niet-pathogene) “missense” varianten in *CACNA1H* en *CACNA1I* werkt als modifierende factor die bijdraagt aan het krijgen van hemiplegische migraine.

Tenslotte bevat **hoofdstuk 10** van dit proefschrift een algemene discussie van alle resultaten en worden overwegingen en suggesties voor toekomstig onderzoek gegeven.