

EL POLIMORFISMO G1465A DEL GEN GABBR1 ES UN MARCADOR DE RIESGO PARA EL DESARROLLO DE EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO

MARCELO A. KAUFFMAN¹, DAMIAN CONSALVO², ESTRELLA M. LEVY³,
CRISTINA E. PAPAYANNIS⁴, JOSE MORDOH⁵, SILVIA S. KOCHEN⁶

¹Médico, Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires; ²Doctor en Medicina, Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires; ³Centro de Investigaciones Oncológicas, Instituto Flemming, Buenos Aires; ⁴Médico, Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires; ⁵Doctor en Medicina, Centro de Investigaciones Oncológicas, Instituto Flemming, Buenos Aires; ⁶Doctor en Medicina, Centro de Epilepsia, División Neurología, Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires
Centro de Epilepsia. División Neurología. Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires

Resumen *Introducción:* Aunque el síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH) fue considerado como un trastorno adquirido, actualmente es aceptado que factores genéticos serían importantes en su génesis. El polimorfismo G1465A del gen del receptor para GABA tipo B (GABBR1) fue asociado con un mayor riesgo a padecer Epilepsia del Lóbulo Temporal. Sin embargo, estudios recientes fallaron en encontrar esta asociación, existiendo controversia sobre el rol que el mencionado polimorfismo tiene en el desarrollo de esta enfermedad. *Objetivos:* Investigar la asociación entre el polimorfismo G1465A de GABBR1 y el riesgo a padecer EMTEH. Estudiar la asociación genética con características clínicas particulares de la enfermedad. *Métodos:* Seleccionamos 52 pacientes con diagnóstico de EMTEH y 39 controles sanos coincidentes en características étnicas con los pacientes. Realizamos la genotipificación del polimorfismo G1465A de GABBR1 en todos ellos mediante PCR-RFLP. *Resultados:* El polimorfismo G1465A fue más frecuentemente observado en los pacientes que en los controles. ($p=0,00013$) El genotipo A/G fue encontrado en 23 pacientes (44%) y en 3 controles (8%). La portación del genotipo A/G confiere un riesgo 9,5 veces mayor para el desarrollo de EMTEH que la portación del genotipo G/G. (OR 9,51; IC 95% 2.59-34.87). Los pacientes portadores del genotipo A/G tuvieron una mayor frecuencia de crisis nocturnas. ($p=0,01$). *Conclusión:* El polimorfismo G1465A del gen GABBR1 es un marcador de riesgo para el desarrollo de EMTEH.

Palabras Claves: Epilepsia, Esclerosis del Hipocampo, Factores Genéticos, Estudio de Asociación, GABA

Summary *The GABBR1 G1465A polymorphism is a risk marker for the development of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis.* *Introduction:* Although, the syndrome of Mesial Temporal Lobe Epilepsy with Hippocampal Sclerosis (MTLEHS) has been considered an acquired disorder, recent evidence has indicated that genetic factors are important in its genesis. The G1465A polymorphism of the GABA type B receptor gene (GABBR1) was associated with an increased risk to suffer from Temporal Lobe Epilepsy. Nevertheless, recent studies failed to find this association leading to a state of controversy about the real role of this polymorphism in the development of the disease. *Objectives:* To investigate the association between the G1465A polymorphism of GABBR1 and the risk to develop MTLEHS. To study the genetic association with distinctive clinical features of the disease. *Methods:* We have selected 52 patients with diagnosis of MTLEHS and 39 healthy controls ethnically matched with the patients. We genotyped the G1465A polymorphism of GABBR1 of the whole group by means of a PCR-RFLP assay. *Results:* G1465A polymorphism was more frequently observed in patients than in controls. ($p=0,00013$) The genotype A/G was found in 23 patients (44%) and in 3 controls (8%). To have the A/G genotype increase the risk to develop MTLEHS 9,5 times (OR 9,51; IC 95% 2.59-34.87). The patients having the A/G genotype suffered more frequently from nocturnal seizures. ($p=0,01$). *Conclusion:* The G1465A polymorphism is a risk marker for the development of MTLEHS.

KeyWords: Epilepsy, Hippocampal Sclerosis, Genetic Factors, Association Study, GABA

Introducción

El síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo (EMTEH)¹ fue considerado por mucho tiempo como un trastorno adquirido, sin embargo se ha reconocido recientemente la presencia de factores genéticos en su génesis. Esto se basa en la descripción de formas familiares con patrón de herencia monogénico², en que hasta un 30% de los pacientes refieren la presencia de antecedentes familiares positivos para convulsiones febriles y/o epilepsia³ y en los reportes de la identificación de polimorfismos en seis genes diferentes como factores de riesgo para desarrollar esta enfermedad⁴⁻⁹.

El ácido gamma amino butírico (GABA) es el principal aminoácido inhibitorio del sistema nervioso central mediante su acción a través de receptores ionotrópicos (tipos A y C) que producen corrientes inhibitorias sinápticas rápidas y receptores metabotrópicos (tipo B) que producen una corriente inhibitoria lenta y sostenida. El receptor para GABA tipo B (GABBR) es un heterodímero de 2 subunidades transmembrana relacionadas (tipos 1 y 2). Existe evidencia que indica que cambios en las corrientes inhibitorias gabaérgicas mediadas a través de GABBR1 tienen un rol en la fisiopatología de la Epilepsia del Lóbulo Temporal. Cambios en la expresión de GABBR1 fueron encontrados en hipocampos de pacientes sometidos a lobectomías temporales como tratamiento de su EMTEH¹⁰.

El desarrollo de estudios de asociación resulta ser una herramienta válida para la investigación genética de enfermedades de herencia compleja como la Epilepsia¹¹. En el 2003 fue identificada la asociación de un polimorfismo (G1465A) del gen que codifica para GABBR1 con un mayor riesgo a padecer Epilepsia del Lóbulo Temporal en una población de pacientes italianos⁹. En cambio, cuatro reportes publicados recientemente han fallado en replicar los hallazgos de la primera investigación¹²⁻¹⁵. Esta situación ha generado controversia sobre el rol que el mencionado polimorfismo tiene en el desarrollo de esta enfermedad.

Los objetivos de nuestro trabajo fueron investigar la asociación entre el polimorfismo G1465A del gen codificante de GABBR1 y el riesgo a padecer EMTEH en una población de pacientes con diagnóstico de EMTEH, y la asociación genética con características clínicas particulares de la enfermedad.

Pacientes y Métodos

Sujetos Participantes

El presente estudio incluyó 52 pacientes con diagnóstico de EMTEH y 39 controles sanos no relacionados y sin antecedentes comiciales. Un consentimiento informado, aprobado previamente por la Comisión de bioética del Hospital Ramos Mejía, fue tomado a cada uno de ellos antes de su inclusión. El diagnóstico de EMTEH fue hecho en base a la semiología

clínica de las crisis según lo relatado por el paciente o testigos, en base a los hallazgos electrofisiológicos (EEG de superficie en todos y VideoEEG en alguno de ellos) y en base a los hallazgos de las IRM. Las IRM fueron realizadas de acuerdo a un protocolo de optimización para la detección de EH que incluyó, adquisición volumétrica, T2, FLAIR e IR coronales y axiales, paralelos y perpendiculares al eje mayor del hipocampo. Sólo aquellos pacientes que cumplían completamente el diagnóstico de EMTEH (clínica-EEG + IRM) fueron incluidos. Por otra parte se analizaron otras variables como edad y sexo, tiempo de evolución de la epilepsia, historia familiar para epilepsia, antecedentes de convulsiones febriles, frecuencia mensual de crisis y respuesta al tratamiento farmacológico. Estas variables fueron comparadas en los subgrupos de pacientes resultantes a partir de la genotipificación de los mismos.

Análisis Genético. Genotipificación del Polimorfismo G1465A de GABBR1

A todos los sujetos participantes se le extrajo 10 cc. de sangre venosa mediante venopuntura. De 800 microlitros de sangre entera se extrajo ADN genómico total mediante lisis con TE10, extracción con CTAB, precipitación con Cloroformo/Isopropanol y lavados con Etanol mediante procedimientos estándares. Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó un fragmento de 441 pares de bases flanqueante al exón 7 del gen que codifica para GABBR1. Para ello se utilizó el siguiente par de primers:

5'-AACAGTAACACAAACCCATCC-3' (sense) y
5'-GCATGTTGTAGAAGGTGCC-3' (antisense).

El protocolo de amplificación consistió en la dilución del ADN genómico purificado en 5 microlitros de buffer (*Invitrogen*), 1,5 microlitros de CIMg, 4 microlitros de dntps, 1 microlitro de cada uno de los primers arriba mencionados en un volumen final de 50 microlitros. Dicho volumen fue sometido a 1 ciclo a 95 °C por 5 minutos, agregándose luego 1 U de Taq polimerasa (Hot Start PCR) y seguido luego por 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 1 minuto a 72 °C repetido durante 35 ciclos.

A fin de determinar el polimorfismo G1465A el producto de PCR era sometido a digestión enzimática con 3U de EagI (*New England BioLab*) durante 3 horas en un volumen final de 20 microlitros. El producto de la digestión era visualizado mediante corrida electroforética en agarosa al 2%. El polimorfismo investigado consiste en el cambio de una guanina (G) por una adenina (A). Este cambio resulta en la pérdida de un sitio de restricción o corte para EagI, por lo que cuando el alelo A está presente se observa una banda de 441 pares de bases, indicativa de una falta de digestión, en cambio la presencia del alelo G, significa que se produce la restricción, muestra dos bandas de 258 y 182 pares de bases. Por lo tanto podían inferirse los tres genotipos posibles en la forma de una sola banda de 441 pb para A/A, tres bandas de 441, 258 y 182 pb para G/A y dos bandas de 258 y 182 pb para G/G (ver figura1).

Análisis Estadístico

Las frecuencias de los alelos y genotipos entre pacientes y controles, así como entre los diferentes subgrupos de pacientes fueron comparadas utilizando la prueba de chi cuadrado. Se estableció un nivel de significancia bilateral en 0,05.

El equilibrio de Hardy-Weinberg en casos y controles fue probado con test exacto.

Odds Ratio y sus intervalos de confianza fueron estimados a partir de las respectivas tablas de contingencia.

Se utilizó como herramienta informática el paquete SPSS versión 11.5.

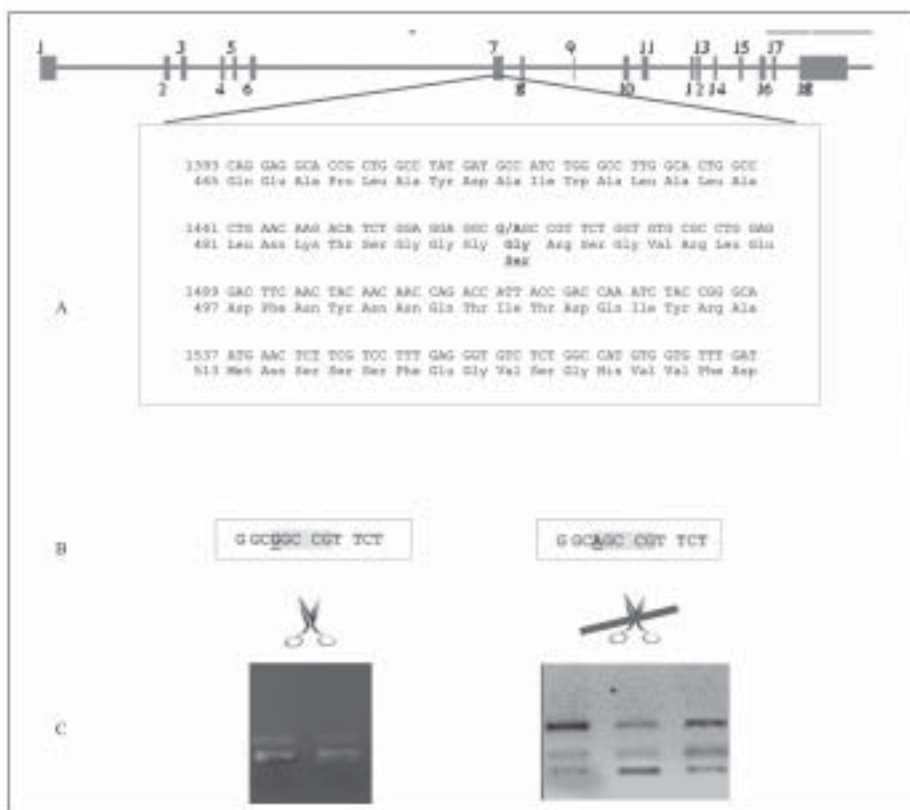


Fig. 1.– A) Secuencia flanqueante nucleotídica y amino-ácídica del polimorfismo G1465A. Sitio polimórfico indicado en azul. B) Sitios de Restricción de EagI, donde puede observarse que el cambio de G por A resulta en la pérdida del sitio de reconocimiento (a la derecha) y la falta de corte por parte de la enzima. C) Gel de Agarosa al 2% de producto de amplificación digerido, donde se observan 2 bandas (a la izquierda) y 3 bandas (a la derecha) indicativas de los genotipos G/G y G/A, respectivamente.

TABLA 1.– Distribución de Genotipos del Polimorfismo G1465A del gen GABBR1 en pacientes con EMTEH y controles

Polimorfismo G1465A	Casos N=52	Controles N=39	ODDS RATIO	Valor de p
A/A	0	0	N/A	0,00013
A/G	23 (44)	3 (8)	9,517 (2.597-34.877)	
G/G	29 (56)	36 (92)	0,105 (0,031-0,365)	

Los valores expresados como n (%)
 Valor de p estimado a partir de X² de Pearson con corrección de Yates

Resultados

La distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas del polimorfismo G1465A del gen codificante de GABBR1 en pacientes y controles se resume en la tabla 1. La distribución genotípica de los controles se ajustó

al equilibrio de Hardy-Weinberg (p= 1), mientras que no ocurre lo propio con la distribución de los casos. (p= 0,05).

La frecuencia de los genotipos fue diferente entre los casos y los controles. (p=0,00013), no habiendo diferencia en el resto de las variables demográficas analizadas

entre estos 2 grupos de sujetos. El genotipo A/G fue encontrado en 23 pacientes (44%) y en 3 controles (8%). La portación del genotipo A/G confiere un riesgo 9,5 veces mayor para el desarrollo de EMTEH que la portación del genotipo G/G. (OR 9,517; IC 95% 2.597-34.877).

No encontramos diferencias significativas en la frecuencia de antecedentes familiares o convulsiones febriles en la infancia y eventos traumáticos entre los dos grupos de pacientes. Se observó una mayor frecuencia de pacientes con crisis nocturnas en el grupo de pacientes portador del genotipo A/G ($p=0,01$, prueba exacta de Fisher). No encontramos asociación entre el polimorfismo investigado y una mayor frecuencia de crisis ni en la respuesta al tratamiento entre los dos grupos de pacientes. En aquellos sujetos con el genotipo A/G se observó con mayor frecuencia la presencia de estado de mal epiléptico y clusters de crisis parciales, aunque sin alcanzar significancia estadística. (ver tabla 2).

Discusión

En el presente estudio hemos observado en la población investigada, que el polimorfismo G1465A del gen codificante de GABBR1 es un marcador de riesgo para el desarrollo de EMTEH.

En el 2003, Gambardella y col, reportaron la asociación del polimorfismo G1465A con un riesgo aumentado

a desarrollar Epilepsia del Lóbulo Temporal en una población italiana⁹, sin embargo en el trabajo mencionado no se investigó en particular a los pacientes con EH. El criterio de selección en nuestro estudio, pacientes con epilepsia del lóbulo temporal más EH, refuerza más aun la asociación encontrada en nuestra serie.

Cuatro reportes recientes fallaron en encontrar asociación entre el polimorfismo investigado y un mayor riesgo a padecer ELT, dos de ellos con un número adecuado de pacientes con EH^{14, 15}. La frecuencia poblacional de G1465A observada en estos estudios, fue menor al 1%, mientras que en nuestra población fue de 8%. Esta disparidad puede obedecer a diferencias poblacionales entre los diferentes estudios. Tal vez, nuestros pacientes sean étnicamente más parecidos a la población investigada por Gambardella, como consecuencia de la importante inmigración italiana del siglo pasado, por lo mismo se puede plantear que determinados polimorfismos resultarían sólo informativos en determinados grupos poblacionales¹⁶.

Un análisis detallado de los pacientes italianos del reporte inicial muestra que esta asociación es más fuerte en aquellos pacientes con formas de epilepsias más severa y de comienzo más temprano⁹. Aunque aquellos pacientes con EMTEH tienen más posibilidades de padecer epilepsia refractaria al tratamiento farmacológico¹⁷, nuestros resultados no apoyan la existencia de asociación entre el polimorfismo investigado y este subtipo de pacientes.

TABLA 2.- Variables Analizadas en pacientes con EMTEH

Variables	Variante G1465A + N=23	Variante G1465A - N=29	ODDS RATIO	Valor de p
Hombres, n (%)	8 (35)	17 (59)	0,376 (0,121-1,168)	0,153*
Mujeres, n (%)	15 (65)	12 (41)		
Edad de inicio de Epilepsia media en años	15,5	15,4		0,969+
Historia de Convulsiones Febriles, n (%)	8 (35)	13 (45)	0,656 (0,217-1,995)	0,654*
Historia Familiar de CF/Epilepsia, n (%)	5 (22)	5 (17)	0,574 (0,187-1,772)	0,505*
Estado de mal, n (%)	9 (39)	6 (21)	2,464 (0,742-8,161)	0,250*
Cluster, n (%)	6 (26)	3 (10)	3,059 (0,723-12,716)	0,262*
Nocturnas, n (%)	19 (83)	15 (52)	4,433 (1,249-15,480)	0,01**
Frec Mensual media de rangos	28,4	23,18		0,227**
Refractariedad, n (%)	12 (52)	19 (65)	0,574 (0,190-1,732)	0,491*

*X² de Pearson con corrección de Yates

**prueba exacta de Fisher

+ prueba de t

** prueba de Mann-Whitney

La caracterización molecular del gen GABBR1 ha revelado la existencia de 5 polimorfismos que resultan en cambios de la secuencia aminoacídica¹⁸. Aquel que cambia una glicina por una serina en la posición 489, dentro de la porción N-terminal del receptor GABA B es el que ha sido investigado por nosotros. Es posible que esta mutación, que afecta la porción extracelular, altere sitios de unión a ligando que resulten en un funcionamiento ineficiente del receptor contribuyendo al mecanismo epileptogénico. Una de las formas de analizar el efecto de una mutación puntual en la función proteica, es mediante el análisis del grado de conservación entre especies de esa posición aminoacídica en la cadena peptídica¹⁹. La posición 489 resulta altamente conservada, ya que un análisis de homología entre 18 especies la mostró conservada en 14 de ellas (ver figura 2). Esto apoya la posibilidad que el polimorfismo G1465A sea funcional. Más aún, la sustitución de una glicina por una serina disminuye la probabilidad de ajuste al modelo de dominio funcional de *receptor ANF* utilizando el programa HMMER2²⁰ sobre la base de datos PFAM²¹.

Variantes alélicas del gen GABBR1 resultan ser un marcador de riesgo biológicamente plausible para el desarrollo de EMTEH. Estudios en humanos y en modelos animales han mostrado el rol de la transmisión gabaérgica, a través del receptor tipo B, en la epileptogénesis

de la Epilepsia del Lóbulo Temporal. Ratones que carecían del gen para GABBR1 desarrollaban un fenotipo similar a la ELT humana caracterizado por convulsiones, actividad epileptiforme en el EEG y trastornos de memoria²². La región CA3 del hipocampo de estos ratones resultó más excitable que la de aquellos que expresaron GABBR1, pareciendo esto estar mediado por receptores glutamatérgicos tipo NMDA y consiguientes cambios crónicos plásticos en redes neuronales del hipocampo²³. En el mismo sentido, una expresión aumentada en un 172% de GABBR1 fue encontrada en hipocampos de pacientes con EMTEH comparada con hipocampos no epilépticos¹⁰. Princivalle y col, también encontraron aumento en los niveles de ARNm de GABBR1 y GABBR2 en distintas regiones del hipocampo provenientes de pacientes con EMTEH²⁴. Este aumento en la expresión podría ser una forma de contrarrestar la hiperexcitabilidad neuronal mediante una inhibición glutamatérgica presináptica²⁴. Se plantea como hipótesis que la Esclerosis del Hipocampo pueda ser consecuencia de una malformación del desarrollo cortical²⁵, resulta interesante que GABBR1 parecería ser importante en la maduración y organización de la corteza cerebral a través de la regulación de procesos migratorios durante la corticogénesis y la modulación de la transmisión sináptica^{26,27}. López Bendito demostró que el bloqueo de GABBR1 impide la migración tangencial

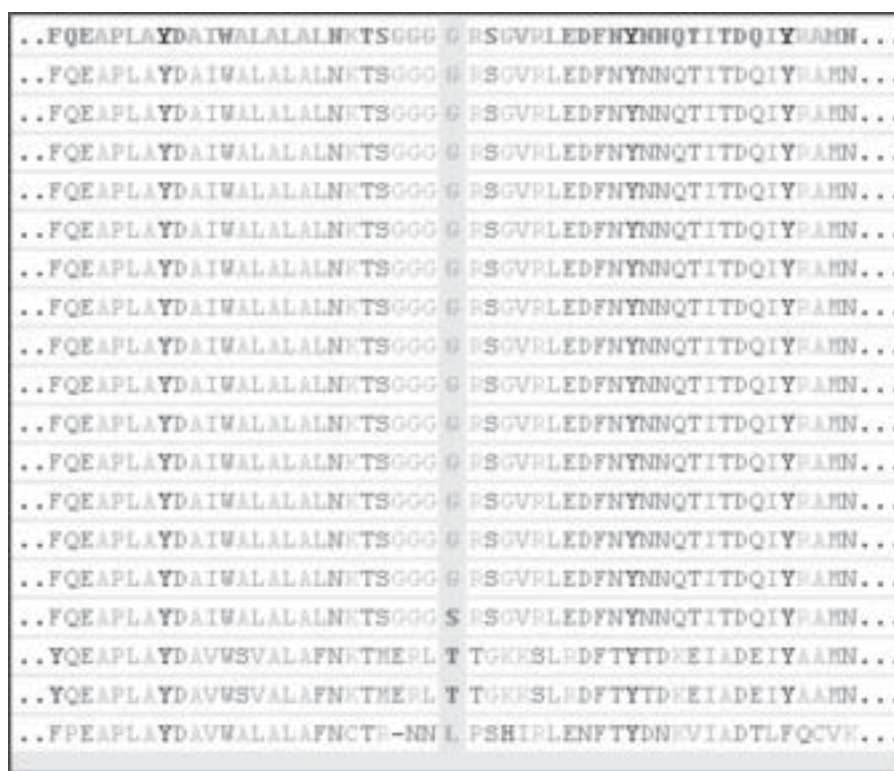


Fig. 2.- Alineamiento múltiple donde se observa la alta conservación del residuo 489 de GABBR1.

interneuronal durante el desarrollo, indicando por tanto el importante rol modulador de esta subunidad en este mecanismo de migración neuronal²⁸.

Las hipótesis sobre cual o cuales son las causas de la EMTEH siguen siendo muchas²⁹. Tradicionalmente, la EMTEH no ha sido considerada un trastorno genético. El síndrome de EMTEH rara vez es observado en más de un miembro en una familia, aunque sí fue observada una alta frecuencia de convulsiones febriles en otros miembros de la misma³. No hay una alta concordancia entre gemelos, aunque sí hay reportes de agregación familiar de características estructurales del hipocampo³⁰.

Variantes alélicas en los genes codificantes de Interleukina 1b⁴, APOE⁵, Proteína Priónica⁸, prodinorfina⁶ y KCNJ10⁷ han sido identificadas como marcadores de un riesgo aumentado para el desarrollo de ELT. Los resultados de nuestro trabajo, apoyan la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de EMTEH, considerándola una enfermedad multifactorial con herencia compleja.

Nuestra observación de la relación entre la presencia de crisis comiciales durante el sueño y la portación del genotipo A/G resulta interesante a la luz del rol que el receptor para GABAB tiene en modular el sueño REM³¹. También resulta remarcable la tendencia observada hacia una asociación entre la variante alélica investigada y una mayor posibilidad de presentar estado de mal epiléptico o crisis parciales en cluster, teniendo en cuenta la más amplia epileptogenicidad postulada como consecuencia de una hipofunción de GABBR1²².

Aunque los estudios de asociación están sujetos a potenciales sesgos y limitaciones³², nuestro estudio es parcialmente replicativo de una asociación previamente reportada y el diseño cumple con los requerimientos para la investigación de factores genéticos en enfermedades de herencia compleja³³. La población de controles ha sido especialmente seleccionada entre sujetos que comparten las mismas características étnicas y geográficas que los pacientes. Cabe mencionarse, que la genotificación del grupo de pacientes no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weimberg siendo indicativo que el efecto genético del polimorfismo es aditivo y no multiplicativo^{32, 34}.

Conclusión

El polimorfismo G1465A del gen que codifica para la subunidad 1 del receptor para GABA tipo B resultó ser en la población estudiada un marcador de riesgo para el desarrollo del síndrome de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo y fue más frecuentemente encontrado en aquellos pacientes que presentan crisis nocturnas.

Bibliografía

1. Wieser HG. ILAE Commission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45 (6): 695-714.
2. Kalachikov S, Evgrafov O, Ross B, Winawer M, Barker-Cummings C, Martinelli Boneschi F, et al. Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. *Nat Genet* 2002; 30 (3): 335-41.
3. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Jackson GD, Berkovic SF. Seizures in family members of patients with hippocampal sclerosis. *Neurology* 2001; 57 (10): 1800-4.
4. Kanemoto K, Kawasaki J, Yuasa S, Kumaki T, Tomohiro O, Kaji R, et al. Increased frequency of interleukin-1beta-511T allele in patients with temporal lobe epilepsy, hippocampal sclerosis, and prolonged febrile convulsion. *Epilepsia* 2003; 44 (6): 796-9.
5. Briellmann RS, Torn-Broers Y, Busuttill BE, Major BJ, Kalnins RM, Olsen M, et al. APOE epsilon4 genotype is associated with an earlier onset of chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2000; 55 (3): 435-7.
6. Stogmann E, Zimprich A, Baumgartner C, Aull-Watschinger S, Holtt V, Zimprich F. A functional polymorphism in the prodynorphin gene promoter is associated with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 2002; 51 (2): 260-3.
7. Buono RJ, Lohoff FW, Sander T, Sperling MR, O'Connor MJ, Dlugos DJ, et al. Association between variation in the human KCNJ10 potassium ion channel gene and seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 2004; 58 (2-3): 175-83.
8. Walz R, Castro RM, Velasco TR, Alexandre V, Jr., Lopes MH, Leite JP, et al. Surgical outcome in mesial temporal sclerosis correlates with prion protein gene variant. *Neurology* 2003; 61 (9): 1204-10.
9. Gambardella A, Manna I, Labate A, Chifari R, La Russa A, Serra P, et al. GABA(B) receptor 1 polymorphism (G1465A) is associated with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60 (4): 560-3.
10. Furlinger S, Pirker S, Czech T, Baumgartner C, Sperk G. Increased expression of gamma-aminobutyric acid type B receptors in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 2003; 352 (2): 141-5.
11. Anderson E, Berkovic S, Dulac O, Gardiner M, Jain S, Laue-Friis M, et al. ILAE Genetics Commission Conference Report: Molecular Analysis of Complex Genetic Epilepsies. *Epilepsia* 2002; 43 (10): 1262-1267.
12. Ma S, Abou-Khalil B, Sutcliffe JS, Haines JL, Hederer P. The GABBR1 locus and the G1465A variant is not associated with temporal lobe epilepsy preceded by febrile seizures. *BMC Med Genet* 2005; 6 (1): 13.
13. Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Berkovic SF, Mulley JC. Is variation in the GABA(B) receptor 1 gene associated with temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 2005; 46 (5): 778-80.
14. Cavalleri GL, Lynch JM, Depondt C, Burley MW, Wood NW, Sisodiya SM, et al. Failure to replicate previously reported genetic associations with sporadic temporal lobe epilepsy: where to from here? *Brain* 2005.
15. Salzman A, Moulard B, Crespel A, Baldy-Moulinier M, Buresi C, Malafosse A. GABAB Receptor 1 Polymorphism (G1465A) and Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46 (6): 931-933.
16. Chou IC, Tsai CH, Hsieh YY, Peng CT, Tsai FJ. Association between polymorphism of interleukin-1beta-511 promoter and susceptibility to febrile convulsions in Taiwanese children. *Acta Paediatr* 2003; 92 (11): 1356.

17. Consalvo D, Giobellina R, Silva W, Rugilo C, Saidon P, Schuster G, et al. [Mesial temporal sclerosis syndrome in adult patients]. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60 (2): 165-9.
18. Peters HC, Kammer G, Volz A, Kaupmann K, Ziegler A, Bettler B, et al. Mapping, genomic structure, and polymorphisms of the human GABAB1 receptor gene: evaluation of its involvement in idiopathic generalized epilepsy. *Neurogenetics* 1998; 2 (1): 47-54.
19. Johnson MM, Houck J, Chen C. Screening for deleterious nonsynonymous single-nucleotide polymorphisms in genes involved in steroid hormone metabolism and response. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5): 1326-9.
20. Chukkapalli G, Guda C, Subramaniam S. SledgeHMMER: a web server for batch searching the Pfam database. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (Web Server issue): W542-4.
21. Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, et al. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2004; 32 (Database issue): D138-41.
22. Schuler V, Luscher C, Blanchet C, Klix N, Sansig G, Klebs K, et al. Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA(B) responses in mice lacking GABA(B1). *Neuron* 2001; 31 (1): 47-58.
23. Brown JT, Gill CH, Farmer CE, Lanneau C, Randall AD, Pangalos MN, et al. Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice. *Epilepsy Res* 2003; 57 (2-3): 121-36.
24. Princivalle AP, Duncan JS, Thom M, Bowery NG. GABA(B1a), GABA(B1b) AND GABA(B2) mRNA variants expression in hippocampus resected from patients with temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 2003; 122 (4): 975-84.
25. Fernandez G, Effenberger O, Vinz B, Steinlein O, Elger CE, Dohring W, et al. Hippocampal malformation as a cause of familial febrile convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology* 1998; 50 (4): 909-17.
26. Martin SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH. Differential expression of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J Comp Neurol* 2004; 473 (1): 16-29.
27. Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *Eur J Neurosci* 2002; 15 (11): 1766-78.
28. Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z. Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex* 2003; 13 (9): 932-42.
29. Berkovic SF, Jackson GD. The hippocampal sclerosis whodunit: enter the genes. *Ann Neurol* 2000; 47 (5): 557-8.
30. Kobayashi E, Santos NF, Torres FR, Secolin R, Sardinha LA, Lopez-Cendes I, et al. Magnetic resonance imaging abnormalities in familial temporal lobe epilepsy with auditory auras. *Arch Neurol* 2003; 60 (11): 1546-51.
31. Ullloor J, Mavanji V, Saha S, Siwek DF, Datta S. Spontaneous REM Sleep Is Modulated By the Activation of the Pedunculo-pontine Tegmental GABAB Receptors in the Freely Moving Rat. *J Neurophysiol* 2004; 91 (4): 1822-1831.
32. Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform* 2002; 3 (2): 146-53.
33. Bird TD, Jarvik GP, Wood NW. Genetic association studies: Genes in search of diseases. *Neurology* 2001; 57 (7): 1153-1154.
34. Lee WC. Searching for disease-susceptibility loci by testing for Hardy-Weinberg disequilibrium in a gene bank of affected individuals. *Am J Epidemiol* 2003; 158 (5): 397-400.