

## **OTKA zárójelentés a *Complex Genetics of Idiopathic Epilepsies (CoGIE)* című EUROCORES programban való részvételről**

### Bevezetés

A programban genetikusan öröklődő epilepszia szindrómák genetikai hátterét vizsgálták, epilepsziás családokból gyűjtött vérminták és kontroll csoportok összehasonlítása alapján. Célja volt olyan új gének megtalálása, melyet eddig nem kapcsoltak össze az epilepszia betegséggel. A programnak ebben a részében nem vettünk részt, a vállalt feladatunk a program együttműködő részében a partnerek által talált ritka gének fehérjéinek lokalizációja volt kontroll állatban és kísérleti állatmodellben. A program önálló, másoktól független részében átfedéseket kerestünk a különböző epilepsziás betegségek között – összehasonlítva a TLE modelljeit a TLE betegek műtétileg eltávolított hippocampusával, illetve az idiopátiás epilepszia egy modelljével –, valamint a temporális lebeny eredetű epilepszia modelljében talált proteomikai eltérések és más neurológiai betegségekben érintett fehérjék között.

A genetikai vizsgálatokat úgy tervezték, hogy egy közös adatbázisban majd összehozzák az exom analízis és a teljes genom analízis eredményeit, és akkor fog igazán sok, eddig rejtett gén előkerülni, mint az epilepszia betegségek alapja. Röviden, néhány pontban összefoglalom a genetikai vizsgálatok legfontosabb eredményeit:

1. Az idiopátiás epilepsziákat nem egy, hanem több gén okozza, melyek különböző ritka alléljai feldúsulnak a betegekben. Ezek önmagukban nem okoznak feltétlenül diszfunkciót, csak csoportos előfordulásuk volt jellemző a betegekre.
2. Az érintett gének egyenként csak kis gyakorisággal (1-2%) fordultak elő az egyes betegekben
3. Az érintett gének/allélek különböző mennyiségben, illetve kombinációkban voltak jelen az epilepszia betegekben, nem mindig ugyanazok még ugyanolyan etiológiájú betegségekben sem, még egy családon belül sem
4. A betegek családtagjai között voltak olyanok, akik hordoztak olyan ritka alléleket, mint az epilepszia beteg családtag, de nem voltak epilepsziások
5. Az epilepsziás betegekben talált, epilepsziával összefüggésbe hozott gének nem csak epilepsziát okozhattak, hanem pld. idegfejlődési rendellenességet, szellemi fogyatékoságot, sat. a vizsgált családokban
6. Egyes gének nem csak epilepszia betegek csoportjában, hanem más neurológiai betegségekkel kapcsolatban is előkerültek, mint autizmus, skizofrénia, migrén, sat.
7. A fehérjét nem kódoló régiók mutációja is állhatott a betegség hátterében, pld. ha egy repetitív szakasz túl rigiddé teszi a DNS szerkezetét, és egyes génekben mikrodéléciókat hoz létre egyébként teljesen „egészséges” génekben

A vizsgálat legfőbb metodikai tanulsága volt, hogy rendkívül nehéz különböző módszerek eredményeit összeegyeztetni, és az adatok informatikai feldolgozása sokkal munkaigényesebb, mint azt tervezték. A teljes genom analízis-exom analízis összevetése még nincsen kész, a partnerek tovább folytatják a munkát. Az exom analízisből származó eredmények, ami alapján nekünk a fehérjéket lokalizálni kellett volna, is késedelmet szenvedett, és csak a harmadik évben tudtuk elkezdni ezt a vizsgálatot.

Az eredmények viszont rávilágítottak, hogy nem annyira egyes gének jelenléte vagy hiánya a meghatározó a betegség kialakulásában, hanem sok gén egymással és a környezettel való együttműködése (Kenneth et al. 1995, Gemma et al. 2013, Helbig et al. 2013, EPICURE Consortium et al 2012). Ezért lehetséges, hogy bizonyos mutáns gének jelenléte az egyik

embernél epilepsziával, a másikonál egy másik betegséggel, és akár ugyanazon család többi tagjánál semmilyen kimutatható neurológiai elváltozással nem társul (ILAE Consortium on Complex Epilepsies 2014, EPICURE Consortium et al 2012, Dejanovic et al. 2014).

Mivel céljaink között szerepelt nem csak kontroll agyszövetben, de különböző epilepszia modellekben is megvizsgálni az érintett gének fehérjéit, a fentiek miatt döntöttünk úgy, hogy nem génkiütéses modellt választunk, hanem az absence epilepszia egy beltenyésztett modelljét, mivel az szintén nem egy génen alapul, így hatásmechanizmusában és neurobiológiai hátterében közelebb állhat a valós idiopátiás epilepszia betegségekhez.

Az eredmények ismertetését két részre bontottam, A) önálló projektek, amiben különböző epilepszia modelleket és az emberi TLE epilepsziát hasonlítottuk össze; B) kollaborációs projektek, amelyben az azonosított, epilepsziához köthető gének fehérjéit lokalizáltuk absence epilepszia modellben.

## A) Önálló projektek

### 1. A GABA-A receptor alfa1 alegységének eloszlása TLE epilepszia modelljében és humán epilepsziás betegekben származó hippocampusban

Ezt a projektet régebben kezdtük el, és az volt a cél, hogy az alfa1 alegység előfordulását sejttípusra lokalizáljuk a hippocampusban, és megvizsgáljuk, az egyes interneuron-csoportokban milyen az eloszlása és hogyan változik epilepsziában. A fénymikroszkópos, fluoreszcens kettősfestéseken alapuló morfológiai kvantitatív vizsgálatokkal elkészültünk, és azt találtuk, hogy az interneuronokon megnő a GABA-A receptor alfa1 alegységet tartalmazó formájának mennyisége. Ez azért fontos, mert ez az alegység közvetíti a GABAerg támadáspontú antiepileptikumok hatását, ezért kulcsfontosságú epilepsziában (Tóth K. et al 2013). Azonban a receptoralegység pontos lokalizációját már nem tudtuk elektronmikroszkóposan megvizsgálni, mert közben elfogyott a humán anyag, ami elektronmikroszkópos vizsgálatra alkalmas lett volna. Az utóbbi 3 évben sikerült több, rövid post mortem idejű emberi agyat perfundálni, és a kollaborációs partner szintén részt vett a CoIGE programban, ezért úgy döntöttünk, befejezzük a vizsgálatot, hiszen eredményeinket össze tudjuk vetni az ő vizsgálateival kainátos állatmodellben (Sperk et al, 1998, Furtinger et al, 2003, Drexel et al, 2013), és ez volt a projektben az egyik vállalásunk: különböző modellek és az emberi agyban talált változások összehasonlítása.

Azonban mind szendvics módszerrel, DAB vizualizáció mellett, mind immunarany módszerrel azt találtuk, hogy az alfa1 alegységet tartalmazó GABA-A receptorok dominánsan extraszinaptikus elhelyezkedésűek. Ez teljesen ellentmondott az eddigi fiziológiás és farmakológiai eredményeknek, melyek szerint a receptor a szinapszisokban található. Én azt javasoltam, fogadjuk el az immunarany reakció eredményét döntőnek, Sperek professzor azonban óvatosságra intett, és a mintavétel kiterjesztését kérte.

Tavaly októberben volt intézetünkben egy szuperrezolúciós mikroszkópiával foglalkozó szimpózium, ahol Katona István csoportja részéről bemutatásra került egy olyan új módszer, mely lehetővé teszi a fluoreszcens jelek STORM mikroszkópos képének a konfokális mikroszkópban látható képpel való összevetését, így a jel térbeli eloszlása más festéssel jelölt objektummal összeköthető, és pontosan lokalizálható. (Dudok et al., 2015). Specifikusan a fenti célra fejlesztett saját szoftverük (Barna et al., 2014) segítségével egy olyan receptor

eloszlását vizsgálták, mely immunarany módszerrel dominánsan extraszinaptikus lokalizációjának mutatkozott, de STORM-mal kiderült, hogy a szinapszisban is van, méghozzá ugyanolyan mennyiségben, mint extraszinaptikusan.

Ez az eredmény mélyen elgondolkoztatott. Lehetséges, hogy az általunk immunjelölésre használt ABC-reakción alapuló szendvics módszer, illetve az ezüsttel amplifikált immunarany módszer olyan nagyméretű jelet produkál, hogy annak létrejötte egy olyan kis térben, mint a szinaptikus rés, már gátolt, ezért ott nem vagy kevesebb jelet látunk, míg a szinapszisokon kívül többet, ebben az esetben fals pozitív eloszlást fogunk kapni extraszinaptikus lokalizációra. Ráadásul, a nagyméretű csapadék képződése a kimutatandó objektum mennyiségére is fals eloszlást adhat, mivel kis mennyiségű anyagot a kevés, nehezebben kialakuló csapadékkal/ezüstkomplexszel rosszabbul fogunk látni, a nagy mennyiségű, szabad elhelyezkedésű objektumokon viszont felerősödik a jel. Ez a jelenség nem, vagy kisebb mértékben zavarja fluoreszcens jel megfigyelését, mert az sokkal kisebb, a kétlépéses immunreakcióban a jel a secunder antitesthez kötött kicsi festékmolekula.

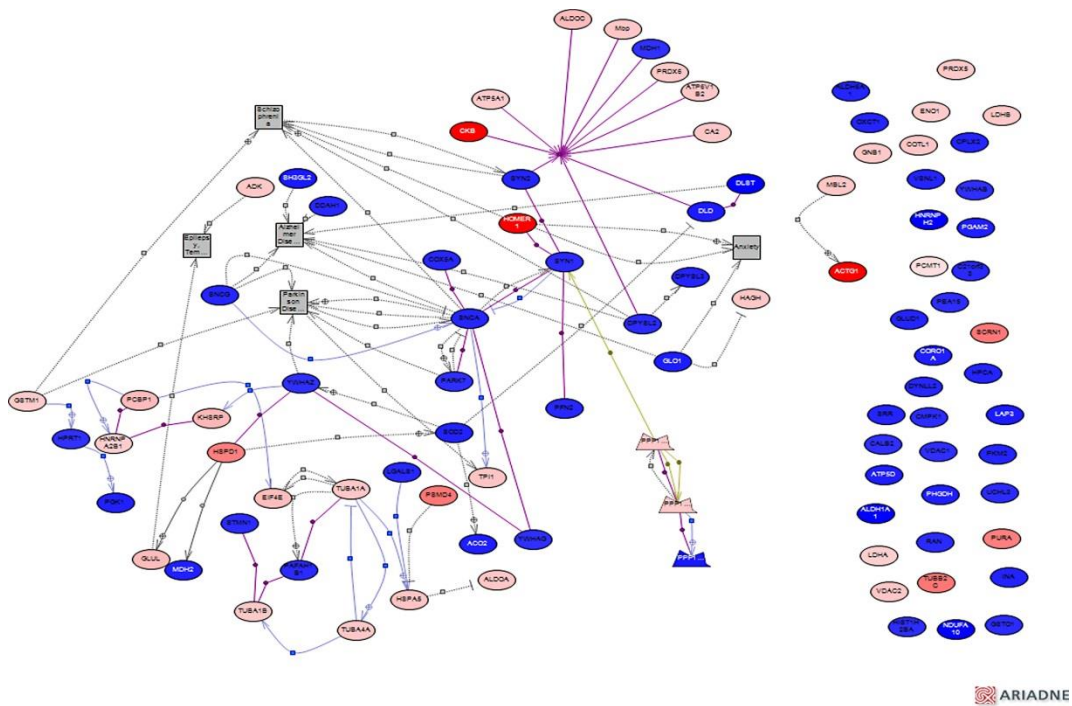
Két lehetőségünk van az eredmények megjelentetésére:

- Jelen formájában, csak a fénymikroszkópos adatok bemutatásával, nem törődve a lokalizációval.
- Megismételjük a vizsgálatot valamilyen szuperrezolúciós technikával, hogy jel méretéből adódó hamis eloszlást kiküszöböljük. Ez azért is fontos lenne, mert, mint a bevezetőben említettem, az alfa1 alegységnek fontos farmakológiai szerepe van, ezért lényeges a pontos lokalizáció megismerése. Ebben az esetben később lesz publikáció.

## 2. Proteomikai vizsgálatok a temporális lebeny eredetű epilepszia (TLE) pilocarpine-indukálta modelljében

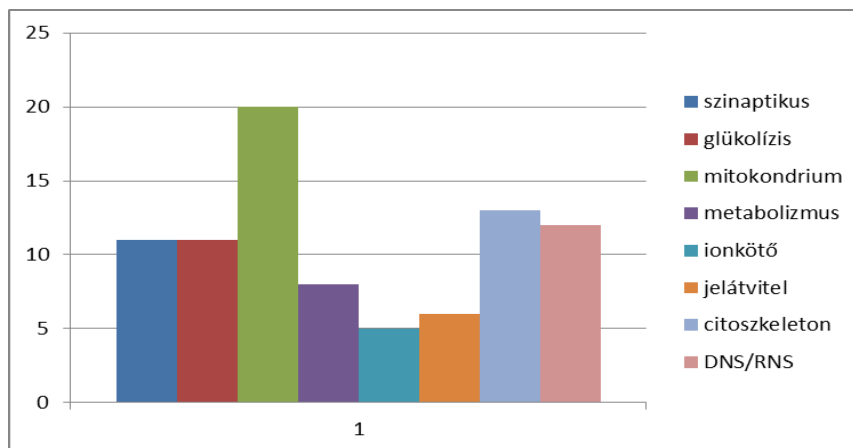
Az általunk használt pilocarpine modell (Maglóczky et al. 2010, Karlócai et al. 2011) proteomikai vizsgálatából származó adatokat elemeztük többféle szempont szerint. Azt találtuk, hogy a spontán visszatérő rohamokat mutató, szklerotikus egerekben 1 hónappal a pilocarpine kezelés után számos fehérje expressziós szintje megváltozik, ezeket különböző funkcionális csoportba soroltuk (pld. citoskeletális fehérjék, jelátvitelben résztvevő fehérjék, mitokondriális fehérjék stb.). Ezután elemeztük a fehérje-változások átfedését egyéb – nem temporális lebeny eredetű – epilepsziákkal és más neurológiai kórképekkel (pld. skizofrénia, Alzheimer-kór, Parkinson-kór, stb.) Magó et al., 2012).

1. **ábra.** A TLE pilocarpine-indukálta modelljében megváltozott expressziót mutató gének összefüggései más neurológiai betegségekkel, mint szkizofrénia, Alzheimer-kór, Parkinson-kór.



Kiderült, hogy több neurológiai kórképben megváltozó fehérje mutat átfedést a modellünkben talált változásokkal, leginkább a szkizofrénia és a Parkinson-kór, legkevésbé a szorongás. Az idiopátiás epilepsziákkal is találtunk közös pontokat, melyről előadást tartottunk Dr. Altmann Anna gyermekneurológussal. Nevezetesen, a Dravet-szindróma (talán a legsúlyosabb idiopátiás epilepszia-kórkép) ketogén diétával való kezelésének egyik lehetséges magyarázatára utalnak a mi adataink, melyek az epilepsziás állatokban leromlott energia-metabolizmusra – elsősorban a cukoranyagcserét illetően – hívják fel a figyelmet.

2. **ábra:** Az epilepsziás állatokban változást mutató fehérjék száma a fehérjék különböző funkcionális csoportjaiban



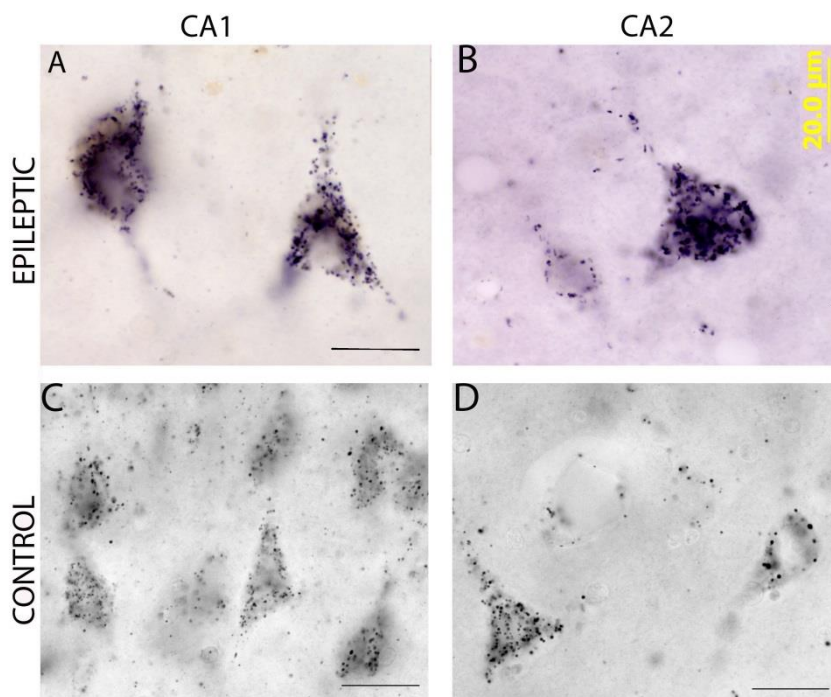
Közben számos, változást mutató fehérje elleni primer antitestet szereztünk be, hogy morfológiailag is meg tudjuk vizsgálni a változó fehérjék lokalizációját. Sikerült igazolnunk, hogy a szintén mitokondriális szuperoxid dizmutáz enzim expressziója valóban megnövekszik, ahogyan azt a proteomikai adatok sugallták. Szintén beigazolódott a calretinin-tartalmú sejtek számának csökkenése, melyet a proteomikai vizsgálatban a fehérje expressziójának csökkenése kísért. A citoszkéletális fehérjék epilepsziás állatokban megnövekedett expressziója összhangban állt az epilepsziás állatokban kimutatható sarjadzással (Maglóczy and Freund, 2005).

Ezek az eredmények készen vannak, azonban úgy döntöttünk, nem publikáljuk őket addig, míg cikket nem írtunk a mitokondriális fehérjék megváltozott mennyiségéről az általunk használt modellben és TLE epilepsziában. Ha alá tudjuk támasztani többféle, már közölt adattal, várhatóan könnyebben tudjuk publikálni ezt az adathalmazt, és igazolni a mitokondriális fehérjék változásának fontosságát.

### 3. A mitokondriumok működésének monitorozása citrát szintáz enzim eloszlásának vizsgálatával TLE betegek műtétieltávolított hippocampusán

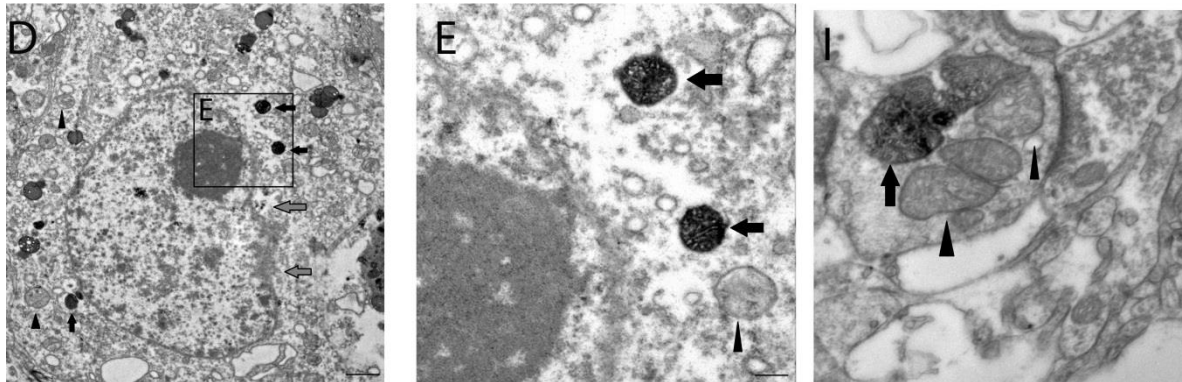
A citrát szintáz (CS) a citrátkör első enzime, minden metabolikusan aktív sejtben megtalálható, azon mitokondriumokban ahol ATP szintézis folyik. Éppen ezért elterjedten használják az ép, működő mitokondriumok kimutatására. (Holloszy et al., 1970; Spina et al. 1996; Leek et al., 2001) Mivel a proteomikai vizsgálatok a mitokondriumok működésének sérülésére utaltak, ez az enzim ideálisnak tűnt a mitokondriumok metabolikus épségének monitorozására. CS-immunfestett epilepsziás hippocampusokban megfigyelhető az immunfestés régióspecifikus eltérése a kontrolltól. A gyrus dentatus és a CA3 régiók inhomogénné váltak, a CA2 régió számos esetben erősödést mutatott a kontroll mintákhoz képest. A CA1 a nem szklerotikus mintákban a kontrollhoz hasonló maradt, a szklerotikus hippocampusokban jelentős gyengülést mutatott (Tóth E. et al. 2014).

**3. ábra:** CS-immunfestett sejtek kontroll és epilepsziás humán hippocampus CA1 és CA2 régiójában



Az elektronmikroszkópos validálás során azonban azt találtuk, hogy az egyes mitokondriumokban a CS eloszlás inhomogén.

**4. ábra:** CS-immunfestett mitokondriumok a epilepsziás hippocampus CA1 régiójából. A D kép bekeretezett része az E képen nagyítva látható, két mitokondrium teljesen festett (nyíl), egy finoman elosztatott pöttyöket tartalmaz (nyílhegy), az F képen pedig egy részben festett (nyíl) és több CS-negatív mitokondrium látható (nyílhegyek)



Az inhomogén festődést létrehozhatja a mitokondriumok metabolikus aktivitásában mutatkozó különbség, de a negatív mitokondriális festést az 1-es pontban már említett, kis teremben kisebb mennyiségű anyag kimutatásának nehézsége is okozhatja. Kis mennyiségek esetén sokkal kisebb jel keletkezik, mint a nagy mennyiségben előforduló kimutatandó fehérjék esetén, ezért ahol csak kevés CS lenne, ott egyáltalán nem látunk semmit.

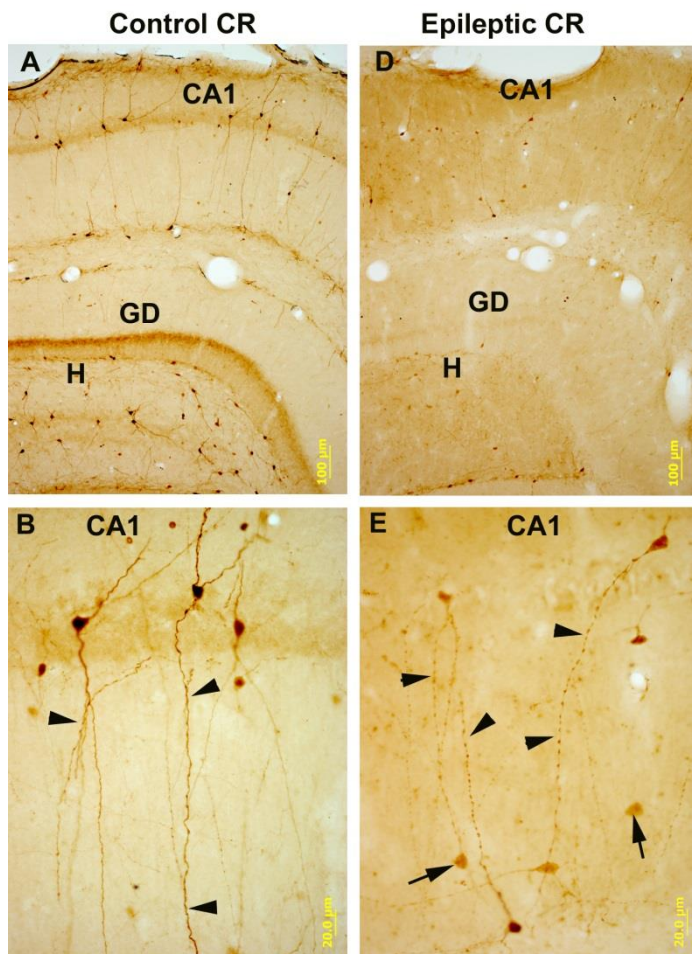
A kérdés tisztázására további vizsgálatokat kell végeznünk, lehetőleg STORM mikroszkóppal.

#### 4. Calretinin-immunreaktív sejtek sorsának alakulása humán TLE epilepsziában, valamint a TLE pilocarpine- és kainát-indukálta krónikus modelljében.

A calretinin (CR)-tartalmú interneuronok kulcsszerepet játszanak a kérgi gátló hálózatok működésének fenntartásában. Közéjük tartoznak az interneuron-specifikus gátlósejtek, melyek a dendritikus gátlósejtek működését szinkronizálva szükségesek a dendriteket beidegző, így a bemenő jelek plaszticitásáért felelős gátlás fenntartásához, mely epilepsziában megsérül. Erről a témáról az elmúlt 20 évben több cikket is írtunk (Maglóczky and Freund, 1993, Maglóczky and Freund, 1995, Maglóczky and Freund, 2005, Tóth et al., 2010), de a modelleket még sosem mutattuk be közös tanulmányban az emberi hippocampussal.

Összefoglalva, a CR-tartalmú sejtek nagyon egységesen viselkednek a TLE krónikus modelljeiben és humán epilepsziás hippocampusban. Számuk csökken, dendritjeik feldarabolódnak, funkciójukat így nem képesek ellátni nem-szklerotikus hippocampusban sem, ahol jelentős principális sejt pusztulás nincsen, a szklerotikus hippocampusban pedig szignifikáns számcsökkenést mutatnak. Ezért új terápiás célpontot képezhetnek, mivel, ha sikerülne megakadályozni sérülésüket és pusztulásukat, az citoprotektív és rohamgátló hatású lehetne (Tóth and Maglóczky, 2014).

**5. ábra:** CR-immunopozitív sejtek számának csökkenése kainát-indukálta epilepsziában, 1 hét túlélés után. A B és C ábrán nyílhegyek mutatják a dendritek lefutását, az epilepsziás CA1 régióban a dendritek felszokoznak, a sejtek (nyilak) sokkal halványabbak, egyesek elvesztik dendritjüket.



Az összehasonlító vizsgálatból összefoglaló cikk készült, mely a *Frontiers in Neuroanatomy*-ban jelent meg, külön, a CR-tartalmú sejtekkel foglalkozó Research Topic keretében, melynek egyik szerkesztője voltam.

### **B) Kollaborációs projectek**

A harmadik évben, több, mint egy év késéssel, kaptunk egy listát az idiopátiás epilepsziában érintett új génekről, és elkezdjük vizsgálni fehérjéik eloszlását az absence epilepszia állatmodelljében.

Az általában gyermekeket és tizenéves fiatalokat sújtó absence epilepszia hátterében álló neurobiológiai mechanizmusok emberben etikai okokból csak korlátozottan vizsgálhatók, ezért számos más neurológiai és neuropszichiátriai betegséghez hasonlóan szükségessé vált a szindróma állatmodelljének létrehozása. Az 1980-as években végzett elektroencefalográfias (EEG) vizsgálatokból világossá vált, hogy kezeletlen patkányok agykérgéről és kéregalatti struktúráiból spontán kialakuló, generalizált és szinkronizált, kétoldali túskehullám-kisülések („spike-and-wave discharges” – SWD) vezethetők el (Vergnes et al., 1982; Van Luijteleaar és Coenen, 1986), melyek nagyfokú hasonlóságot mutatnak az emberi absence epilepsziás rohamok során regisztrálható mintázatokkal. A felfedezést követően az SWD epizódokat mutató Wistar patkányokból beltenyésztett törzset hoztak létre Strasbourgan (Genetic

Absence Epilepsy Rats from Strasbourg – GAERS; Danober et al., 1998), mely mára a genetikus megalapozottságú idiopátiás absence epilepszia jól validált modelljévé vált. A GAERS mellett egy másik beltenyésztett patkánytörzs, az eredetileg az Egyesült Királyságban létrehozott, majd Rijswijkben tartott Wistar Albino Glaxo (WAG/Rij) egyedei bizonyultak az absence epilepszia alkalmas és népszerű állatmodelljének (Sarkisova és van Luijteleaar, 2011). A GAERS és WAG/Rij patkányok tüskehullám-kisüléseinek EEG-jellegzetességei, a rohamok ontogenezise és farmakológiai reaktivitása rendkívül hasonló. A két törzs csupán néhány tulajdonság mentén mutat eltérést, és mindkettő hűen leképezi a humán absence epilepszia elektrofiziológiai, farmakológiai és viselkedési jellemzőit (Depaulis és van Luijteleaar, 2006). Tudományos vizsgálatukhoz rohammentes fenotípust mutató kontroll törzsek állnak rendelkezésre (GAERS: Non-Epileptic Control [NEC]; WAG/Rij: August Copenhagen Irish [ACI]).

A GAERS és WAG/Rij patkányok közös – és az emberi absence epilepsziával rokon – jellemzője, hogy tüskehullám-kisüléseik többsége viselkedésesen passzív ébrenlét, vagy az alvás és éber állapot közti átmenet időszakában jelentkeznek; az aktív arousal (pl. jutalmazott tanulási feladatban) gátolja a rohamokat. Az SWD-k időtartama alatt a viselkedés félbeszakad, a környezeti ingerekre való válaszkészség jelentősen csökken, az állatok mozdulatlanok, esetleg enyhe nyaki izomtónus-csökkenés, illetve bajuszrángás figyelhető meg. A roham elmúltával a megszakított viselkedés folytatódik. GAERS patkányokban az első tüskehullám-kisülések harmincnapos korban jelentkeznek, ekkor azonban még nem minden egyed érintett – a 100%-os arányt a harmadik hónap végére érik el (Vergnes et al., 1986). A kisülések gyakorisága négy- és hathónapos kor között növekszik, az időszak végén kb. 1,3 SWD / perc. Az SWD-k EEG-frekvenciája 7-11 c/s, feszültség-tartományuk 300-1000  $\mu$ V, időtartamuk 17-33 s közt változik. A WAG/Rij törzs esetében a rohamok kifejlődése ontogenetikusan későbbi fejlemény: az elsők 60-80 napos korban regisztrálhatók. A 90 napos patkányok közül csak minden másodikból vezethetők el SWD-k, a teljes érintettség elérése hathónapos korban várható. A WAG/Rij állatok rohamai ritkábbak és rövidebbek a GAERS törzssre jellemzőkhöz képest: óránként 15-20 tüskehullám-kisülés vezethető el belőlük, melyek időtartama átlagosan öt másodperc. A frekvencia és feszültség-tartomány tekintetében a két törzs megegyezik (Meeren et al., 2002).

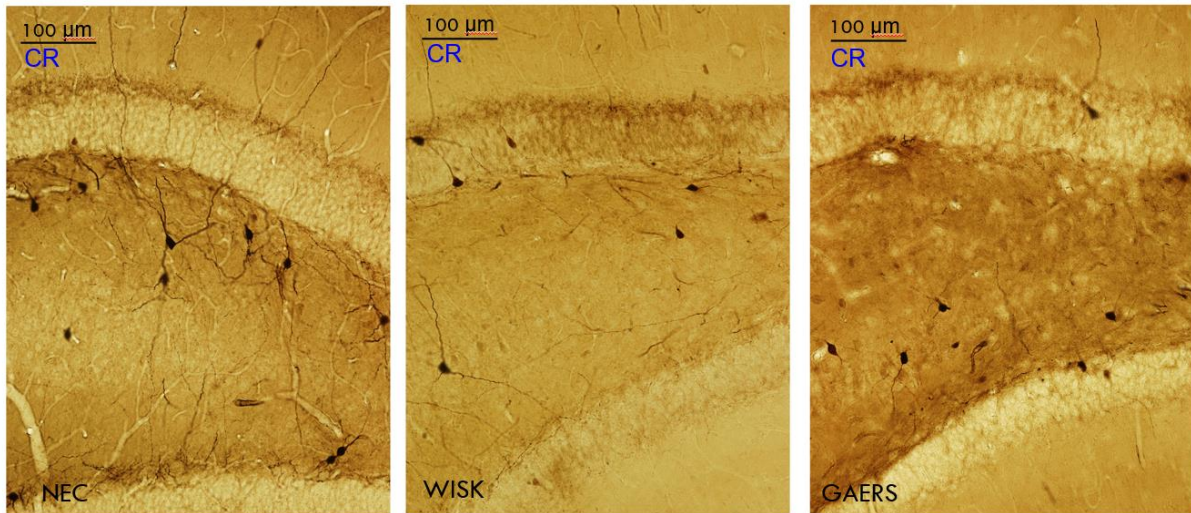
### **1.A GAERS patkányok interneuron-típusainak általános vizsgálata a kéregben és a hippocampusban.**

Ezzel az összehasonlítással kezdtünk, hogy lássuk, milyen átfedést találunk az interneuronok érzékenysége/rezisztenciája terén a TLE modelljeiben és humán TLE betegek hippocampusában tapasztaltakhoz képest.

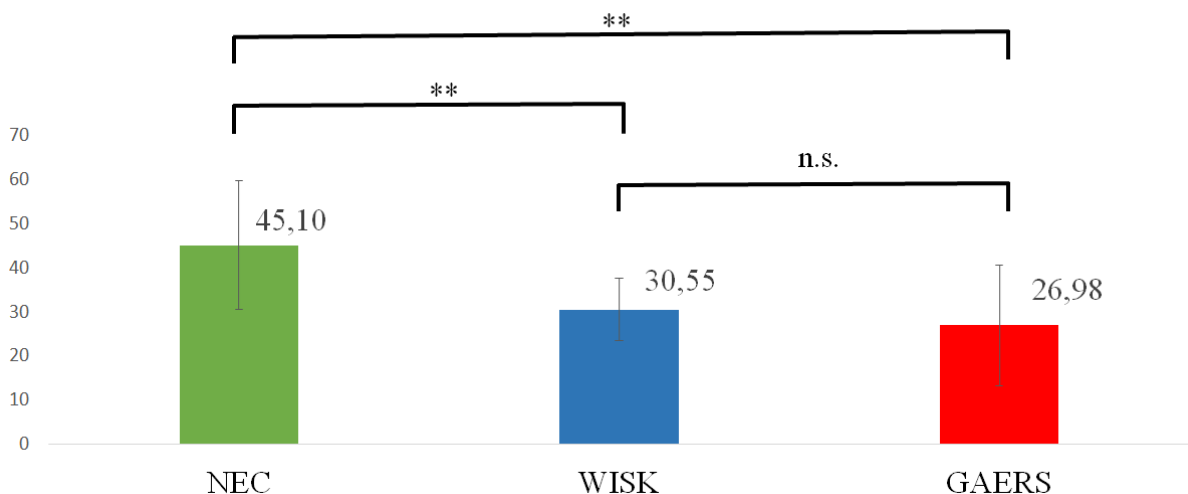
Eredményeink alapján a CR-immunpozitív sejtek száma csökken mind a hippocampus hilusában, mind pedig a S1 szomatoszenzoros kéreg infragranuláris régiójában a GAERS modellben. Ugyanezt a változást találtuk normál Wistar patkányok hilusában is, amelyek a GAERS vad típusának tekinthetők, és némelyikben szintén előfordulnak absence epilepsziás rohamok.



**6. ábra.** Calretinin-immunopozitív interneuronok eloszlása a gyrus dentatus hilusában. Míg a nem-epilepsziás kontrollcsoport (NEC) hiláris régiójában számos ép dendritfával rendelkező sejt látható, a Wistar kontroll és absence epilepsziás patkányok esetében (WISK és GAERS) a nyomon követhető lefutású dendritekkel rendelkező immunopozitív sejtek száma jelentősen csökken.



**7. ábra.** Calretinin-immunopozitív interneuronok denzitáértékei a nem-epilepsziás kontroll (NEC), Wistar kontroll (WISK) és absence epilepsziás (GAERS) csoport hilusában. (Calretinin-immunopozitív sejtek száma / hiláris mm<sup>2</sup>) Kruskal-Wallis próba Bonferroni-korrigált Mann-Whitney U post-hoc tesztekkel; Kruskal-Wallis H (2, N=45) = 11,612, p<0,03; \*\*: p<0,01

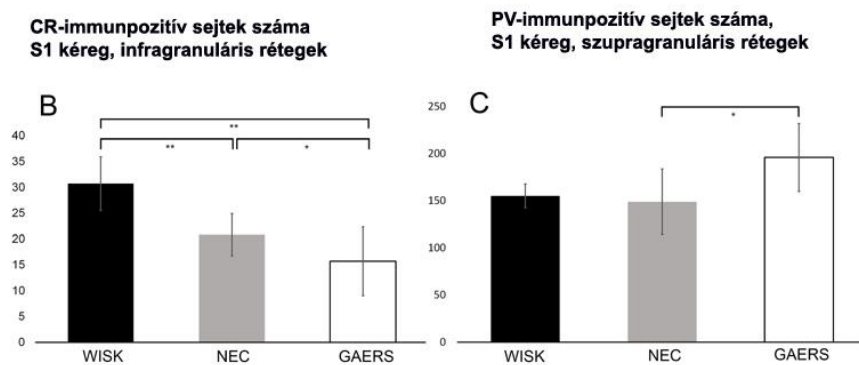


Hasonló csökkenést tapasztaltunk a hiláris parvalbumin (PV)-tartalmú sejtek számában is a hippocampusban, GAERS állatokban.

A GAERS patkányok kérgi régiójában viszont, mely feltehetően szerepet játszik az absence rohamok létrehozásában (Meeren, 2002), a periszomatikus gátlásért felelős PV-tartalmú sejtek

jóval nagyobb számban voltak jelen, mint akár a Wistar, akár a nem-epileptikus kontroll állatokban (non-epileptic controls – NEC).

**8. ábra:** CR- és PV-immunpozitív sejtek számának alakulása a szomatoszenzoros kéreg infra- (B) és szupragranuláris rétegeiben (C). A változás statisztikailag szignifikáns volt Kruskal-Wallis próba Bonferroni-korrigált Mann-Whitney U post-hoc tesztekkel; A sejtek száma 1 mm<sup>2</sup> egységnyi kérgi területre van megadva.



Megvizsgáltuk a calbindin-tartalmú piramis sejteket is a kéregben, és noha sejtpusztulást nem találtunk, a calbindin-immunfestés a sejtek egy részében elhalványodott, míg a szomszédos sejtekben kontrollszerű maradt a GAERS állatok agykérgében. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a TLE epilepszia állatkísérletes modelljében és emberi epilepsziás hippocampus gyrus dentatusában, a szemcsesejteken.

A talált jelenségek arra utalnak, hogy a hippocampusban a legérzékenyebb régióban, a gyrus dentatus hilusában hasonló interneuronok mutatnak érzékenységet a GAERS patkányokban, mint TLE-ben. Elgondolásunk szerint ez az epilepsziás rohamok következtében megnövekedett idegi aktivitás következménye.

A kéregben talált magasabb PV-immunopozitív sejtszám valószínűleg felelős a rohamok kialakulásáért, mivel nagyobb mennyiségű periszomatikus gátlósejt a szupragranuláris régióban a II-III. rétegi piramis sejtek hatékonyabb szinkronizációját okozhatja, így, a thalamussal együtt, részt vehet az absence epilepszia kialakításában.

Eredményeinket a MITT 2015. évi konferenciáján poszter formájában mutatjuk be.

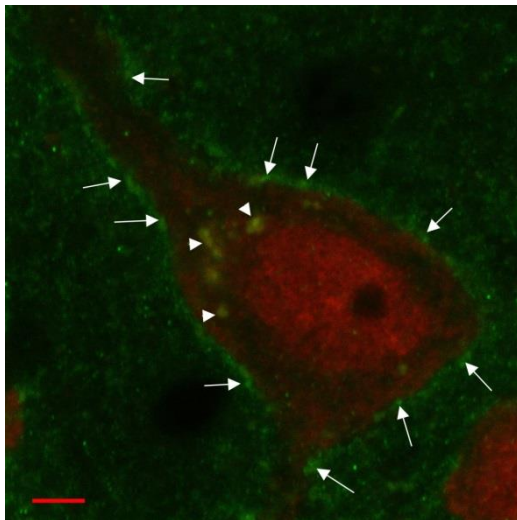
## 2. Idiopátiás epilepsziákban talált új gének fehérjéinek vizsgálata GAERS patkányokban

A teljes lista még nem létezik, de a részleges listát sem adhatom meg még, összesen háromszor írtam alá titoktartási kötelezettséget, mivel a vizsgálatok a teljes genom-analízis témakörében még nem fejeződtek be, és még nem jelentek meg egyes cikkek, melyek az új géneket bemutatják. Egy részükről azonban már léteznek publikációk, ezeket ismertethetem. A nátriumcsatornák egyes génjei, pld. az SCN1A, SCN8A többféle epilepsziában, de migrénben is érintett (Larsen et al. 2015, Scheffer 2012). Esetükben azonban sajnos semmilyen specifikus immunfestést nem sikerült elérnünk az antitestekkel. Ugyanígy jártunk más ioncsatornákkal, pld. egy klorid csatornával, illetve egy citoskeletális fehérjével is. Sikert a szintaxin 1B (STX1B) vizsgálatával értünk el.

A STX1B a preszinaptikus membránon, a szinaptikus fehérje interakciós motívban (synprint) elhelyezkedő T-SNARE fehérje, jellemzője, hogy interakciót létesít Feszültség Vezérelt Calcium Csatornák (FVCC) N-és P/Q-típusával, modulálva a  $Ca^{2+}$  beáramlását a CSP és a SNAP-25 mellett (Mastrogiacomo et al., 1994; Bezprozvanny, Scheller & Tsien, 1995; Wiser, Bennett & Atlas, 1996). Meg kell említeni, hogy az említett cikkek a syntaxin 1A-t tanulmányozták, azonban a syntaxin 1B szekvenciája 84%-ban egyezik az 1A szekvenciájával, így rá is értelmezhetőek a kísérletek. Ugyanis, (1) képes a FVCC-vel kapcsolatot létesíteni és feltételezhetően csökkenteni a beáramló  $Ca^{2+}$  mennyiségét (2) in vitro tanulmányokban kapcsolódik az N-típusú FVCC G-fehérje aktivált  $\beta$  alegységéhez, akárcsak a syntaxin 1A. Viszont homológjával ellentétben nem segíti elő a G-fehérje gátlását (Jarvis & Zamponi, 2005). Feltételezik, hogy egyes idegsejtek más és más STX1 izoforlát expresszálnak, hogy elérjék a sejtben megkívánt  $Ca^{2+}$  mennyiséget. Alátámasztja ezt az a megfigyelés is, hogy tartós potenciáció (long-term potentiation, LTP) során megnövekedik a STX1B kifejeződésének szintje (Hicks et al., 1997). A hippocampus és a kéreg a legérzékenyebb terület az LTP indukciója során és itt a legmagasabb a STX1B kifejeződése (Ruiz-Montasell et al., 1996), ezért is fontos megvizsgálni, mi történik vele epilepsziás állatokban.

GAERS patkányokban a fehérje expressziójának megnövekedését találtuk a hippocampus és a kéreg több területén, melyet az intézetünkben létesült Nikon központ konfokális lézermikroszkópjával mértünk meg fluoreszcens immunfestett metszeteken.

**9. ábra:** Szomatoszenzoros cortex, V-ös réteg, piramissejt, konfokális mikroszkóppal készített felvétel. A fehér nyílhegyek a hamis kettősfestődést mutató, autofluoreszcens lipofuscin cseppeket mutatják. A fehér nyilak mutatják a sejtet pontszerű festődéssel körülvevő stx1b-pozitív profilokat, feltehetően terminálisokat, melyek jól elkülöníthetően látszanak a sejttesttől és proximális dendritektől. A sejttestet NeuN elleni primer antitesttel festettük meg. Skála: 20  $\mu$ m.



Több kérgi rétegből és hippocampális régióból vettünk mintát. Az STX1B-expresszió növekedése csak a hippocampus CA3 a,b régiójában, a moharostok végződési területén, a str. lucidumban bizonyult statisztikailag szignifikánsnak, bár tendenciaként a kéreg V. rétegében, és a CA3c-ben is megfigyelhető volt. Arra következtetünk, hogy szinaptikus átrendeződés zajlik ezeken a területen, melynek két oka lehet: (1) Több stx1b fehérje található az adott területen lévő terminálisokban, vagy (2) megnőtt a terminálisok száma az epilepsziás rohamok miatt kialakuló moharost-sarjadzás hatására (Maglóczy, 2012; Seress L., 2005;

Maglóczky et al., 2000). Ennek ellenőrzésére elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, de ugyanolyan lokalizációs problémába ütköztünk, mint az A) 1. project esetében. A jelet nem lehetett egyértelműen a preszinaptikus régióhoz kötni, ami további, STORM mikroszkópos vizsgálatokat indokol a felvetődő moharost- sarjadzás ellenőrzésére.

Mindkét GAERS állatokon futó project azt igazolta, hogy absence epilepsziás állapotokban is zajlik epilepsziás reorganizáció, és a gátlósejtek érzékenysége a hippocampusban – ahol a valószínűleg a rohamok következtében alakul ki átszerveződés –, nagyon hasonlít a TLE-ben találtakhoz. Mindez magyarázatot adhat arra, miért alakulhatnak ki kevert epilepszia rohamok egyes emberekben, illetve hogyan alakulhat át az absence epilepszia TLE-vé. Másrészt, arra is rávilágít, hogy ugyanazok az epilepsziához kapcsolható gének miért vannak jelen többféle epilepszia szindrómában is, hiszen a neurobiológiai átalakulás érintheti ugyanazokat a gátlósejteket, vagy hozhat létre hasonló sarjadzást többféle epilepszia szindrómában is.

#### A project végrehajtásának kiértékelése:

A vállalt feladatokat nagyrészt teljesítettük, azonban a kapott eredmények jelentős részét nem tudtuk leközoelni. Ennek fő oka, a project kollaboratív részének jelentős késése, mivel a genetikai vizsgálatok nem készültek el az ütemterv szerint. Ezért, hogy ne veszítsünk időt, túl sok önálló projectet kezdtünk el, amelyeket aztán a harmadik évben, amikor végre adatokat kaptunk a genetikai munkacsoportoktól, nem tudtunk befejezni. Személyi változások is nehezítették a végrehajtást, kutatók távoztak/lépett be a projectbe, a projectben folyamatosan TDK hallgatók dolgoztak, ezért is született 2 szakdolgozat a témákból. A hallgatók és az újonnan csatlakozott kutató jelentős idejű képzést igényelt. Nagyszámú eredmény született azonban, melyeket posztereken és egy cikkben publikáltunk eddig, és a jövőben a többi eredményt is publikálni fogjuk. A genetikai vizsgálatot végző kutatókkal is tartom a kapcsolatot, és remélem, hogy tájékoztatni fognak a további génekről is, melyeket epilepsziás betegekben találnak majd. Ők is folytatják a munkát.

Kérem az OTKÁ-t, hogy az eredmények publikálására adjon még 2 évet, és azután értékelje a project végrehajtásának hatékonyságát.

#### HIVATKOZÁSOK

Barna L., Dudok B., Miczán V., Szabó S. I., Horváth A., Matolcsi M., Katona I. A new approach for correlated confocal and superresolution microscopy visualizes the distribution of presynaptic CB1 cannabinoid receptors at the nanoscale. Program No. XXX.XX. 2014 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2014. Online.

Bezprozvanny I., Scheller R., Tsien R. (1995), Functional impact of synaptxin on gating N-type and Q-type calcium channels. *Nature*, **378**, 623-626.

Carvill GL, Weckhuysen S, McMahon JM, Hartmann C, Møller RS, Hjalgrim H, Cook J, Geraghty E, O'Roak BJ, Petrou S, Clarke A, Gill D, Sadleir LG, Muhle H, von Spiczak S, Nikanorova M, Hodgson BL, Gazina EV, Suls A, Shendure J, Dibbens LM, De Jonghe P, Helbig I, Berkovic SF, Scheffer IE, Mefford HC. GABRA1 and STXBP1: novel genetic causes of Dravet syndrome. *Neurology*. 2014 Apr 8;82(14):1245-53. doi: 10.1212/WNL.0000000000000291. Epub 2014 Mar 12.

- Danober, L.; Deransart, C.; Depaulis, A.; Vergnes, M.; Marescaux, C. (1998). Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Progress in Neurobiology* **55**: 27-57.
- Dejanovic B, Lal D, Catarino CB, Arjune S, Belaidi AA, Trucks H, Vollmar C, Surges R, Kunz WS, Motameny S, Altmüller J, Köhler A, Neubauer BA, Epicure Consortium, Nürnberg P, Noachtar S, Schwarz G, Sander T. Exonic microdeletions of the gephyrin gene impair GABAergic synaptic inhibition in patients with idiopathic generalized epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2014 Jul;**67**:88-96. doi: 10.1016/j.nbd.2014.02.001. Epub 2014 Feb 19.
- Depaulis, A.; van Luijelaar, G. (2006). *Genetic Models of Absence Epilepsy in the Rat*. In: Pitkänen, A.; Schwartzkroin, P. A.; Moshé, S. L. (ed.) *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Academic Press. Burlington, MA 01803, USA
- Drexel M, Kirchmair E, Sperk G. Changes in the expression of GABAA receptor subunit mRNAs in parahippocampal areas after kainic acid induced seizures. *Front Neural Circuits.* 2013 Sep **18**;7:142. doi: 10.3389/fncir.2013.00142. eCollection 2013.
- Dudok, B.; Barna, L.; Ledri, M.; Szabó, S. I.; Szabadits, E.; Pintér, B.; Woodhams, S. G.; Henstridge, C. M.; Balla, Y. B.; Nyilas, R.; Varga, Cs.; Lee, S-H.; Matolcsi, M.; Cervenak, J.; Kacsokovics, I.; Watanabe, M.; Sagheddu, C.; Melis, M.; Pistis, M.; Soltesz, I.; Katona, I. (2015). Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nature Neuroscience*, **18**, 75-86.
- EPIPURE Consortium, EMINet Consortium, Steffens M, Leu C, Ruppert AK, Zara F, Striano P, Robbiano A, Capovilla G, Tinuper P, Gambardella A, Bianchi A, La Neve A, Cricchiutti G, de Kovel CG, Kasteleijn-Nolst Trenité D, de Haan GJ, Lindhout D, Gaus V, Schmitz B, Janz D, Weber YG, Becker F, Lerche H, Steinhoff BJ, Kleefuß-Lie AA, Kunz WS, Surges R, Elger CE, Muhle H, von Spiczak S, Ostertag P, Helbig I, Stephani U, Møller RS, Hjalgrim H, Dibbens LM, Bellows S, Oliver K, Mullen S, Scheffer IE, Berkovic SF, Everett KV, Gardiner MR, Marini C, Guerrini R, Lehesjoki AE, Siren A, Guipponi M, Malafosse A, Thomas P, Nabbout R, Baulac S, Leguern E, Guerrero R, Serratos JM, Reif PS, Rosenow F, Mörzinger M, Feucht M, Zimprich F, Kasper C, Schankin CJ, Suls A, Smets K, De Jonghe P, Jordanova A, Caglayan H, Yapici Z, Yalcin DA, Baykan B, Bebek N, Ozbek U, Gieger C, Wichmann HE, Balschun T, Ellinghaus D, Franke A, Meesters C, Becker T, Wienker TF, Hempelmann A, Schulz H, Rüschemdorf F, Leber M, Pauck SM, Trucks H, Toliat MR, Nürnberg P, Avanzini G, Koeleman BP, Sander T (2012) Genome-wide association analysis of genetic generalized epilepsies implicates susceptibility loci at 1q43, 2p16.1, 2q22.3 and 17q21.32. *Hum Mol Genet* **21**:5359-5372.
- Furtinger S<sup>1</sup>, Bettler B, Sperk G. Altered expression of GABAB receptors in the hippocampus after kainic-acid-induced seizures in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 May **12**;113(1-2):107-15.
- Helbig I, Swinkels ME, Aten E, Caliebe A, van 't Slot R, Boor R, von Spiczak S, Muhle H, Jähn JA, van Binsbergen E, van Nieuwenhuizen O, Jansen FE, Braun KP, de Haan GJ, Tommerup N, Stephani U, Hjalgrim H, Poot M, Lindhout D, Brilstra EH, Møller RS, Koeleman BP. Structural genomic variation in childhood epilepsies with complex phenotypes. *Eur J Hum Genet.* 2014 Jul;**22**(7):896-901. doi: 10.1038/ejhg.2013.262. Epub 2013 Nov 27.

- Hicks A., Davis S., Rodger J., Helme-Guizon A., Laroche S., Mallet J. (1997), Synapsin I and syntaxin 1B: key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo. *Neuroscience*, **79**, 329-340.
- Holloszy, J. O.; Oscai, L. B.; Don, I. J.; Mole, P. A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **40**, no. 6.
- Jarvis S. & Zamponi G. (2005), Master or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium*, **37**, 483-488.
- Karlocai MR, Toth K, Watanabe M, Ledent C, Juhasz G, Freund TF, Maglóczy Z (2011) Redistribution of CB1 Cannabinoid Receptors in the Acute and Chronic Phases of Pilocarpine-Induced Epilepsy. *PLOS ONE* 6:(11) p. e27196. (2011)
- Kasperaviciute D, Catarino CB, Matarin M, Leu C, Novy J, Tostevin A, Leal B, Hessel EV, Hallmann K, Hildebrand MS, Dahl HH, Ryten M, Trabzuni D, Ramasamy A, Alhusaini S, Doherty CP, Dorn T, Hansen J, Krämer G, Steinhoff BJ, Zumsteg D, Duncan S, Kälviäinen RK, Eriksson KJ, Kantanen AM, Pandolfo M, Gruber-Sedlmayr U, Schlachter K, Reinthaler EM, Stogmann E, Zimprich F, Théâtre E, Smith C, O'Brien TJ, Meng Tan K, Petrovski S, Robbiano A, Paravidino R, Zara F, Striano P, Sperling MR, Buono RJ, Hakonarson H, Chaves J, Costa PP, Silva BM, da Silva AM, de Graan PN, Koeleman BP, Becker A, Schoch S, von Lehe M, Reif PS, Rosenow F, Becker F, Weber Y, Lerche H, Rössler K, Buchfelder M, Hamer HM, Kobow K, Coras R, Blumcke I, Scheffer IE, Berkovic SF, Weale ME; UK Brain Expression Consortium, Delanty N, Depondt C, Cavalleri GL, Kunz WS, Sisodiya SM. Epilepsy, hippocampal sclerosis and febrile seizures linked by common genetic variation around SCN1A. *Brain*. 2013 Oct;136(Pt 10):3140-50. doi: 10.1093/brain/awt233. Epub 2013 Sep 6..
- Kenneth S. Kendler, MD; Ellen E. Walters, MS; Michael C. Neale, PhD; Ronald C. Kessler, PhD; Andrew C. Heath, DPhil; Lindon J. Eaves, PhD, DSc. The Structure of the Genetic and Environmental Risk Factors for Six Major Psychiatric Disorders in Women Phobia, Generalized Anxiety Disorder, Panic Disorder, Bulimia, Major Depression, and Alcoholism. *Arch Gen Psychiatry*. 1995;52(5):374-383. doi:10.1001/archpsyc.1995.03950170048007.
- Larsen J<sup>1</sup>, Carvill GL<sup>2</sup>, Gardella E<sup>1</sup>, Kluger G<sup>1</sup>, Schmiedel G<sup>1</sup>, Barisic N<sup>1</sup>, Depienne C<sup>1</sup>, Brilstra E<sup>1</sup>, Mang Y<sup>1</sup>, Nielsen JE<sup>1</sup>, Kirkpatrick M<sup>1</sup>, Goudie D<sup>1</sup>, Goldman R<sup>1</sup>, Jähn JA<sup>1</sup>, Jepsen B<sup>1</sup>, Gill D<sup>1</sup>, Döcker M<sup>1</sup>, Biskup S<sup>1</sup>, McMahon JM<sup>1</sup>, Koeleman B<sup>1</sup>, Harris M<sup>1</sup>, Braun K<sup>1</sup>, de Kovel CG<sup>1</sup>, Marini C<sup>1</sup>, Specchio N<sup>1</sup>, Djémié T<sup>1</sup>, Weckhuysen S<sup>1</sup>, Tommerup N<sup>1</sup>, Troncoso M<sup>1</sup>, Troncoso L<sup>1</sup>, Bevot A<sup>1</sup>, Wolff M<sup>1</sup>, Hjalgrim H<sup>1</sup>, Guerrini R<sup>1</sup>, Scheffer IE<sup>1</sup>, Mefford HC<sup>1</sup>, Møller RS<sup>1</sup>; On behalf of the EuroEPINOMICS RES Consortium CRP. The phenotypic spectrum of SCN8A encephalopathy. *Neurology*. 2015 Jan 7. pii: 10.1212/WNL.0000000000001211. [Epub ahead of print]
- Leek, B. T.; Mudaliar, S. R. D.; Henry, R.; Mathieu-Costello, O.; Richardson, R. S. (2001). Effect of acute exercise of citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, **280**, 441-447.
- Zs. Maglóczy, and T.F. Freund (1993): Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield. *Neuroscience* 56(2): 317-336

- Zs. Maglóczy, and T.F. Freund (1995): Delayed cell death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injection into the CA3 subfield *Neuroscience*, 66: 847-860
- Maglóczy Zs., Wittner L., Borhegyi Z., Halasz P., Vajda J., Czirjak S., Freund T. (2000), Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience*, **96**, 7-25.
- Maglóczy, Z. & Freund, T.F. (2005) Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus. *Trends Neurosci*, **28**, 334-340.
- Zsófia Maglóczy, Kinga Tóth, Rita Karlócai, Sára Nagy, Loránd Eröss, Sándor Czirják, János Vajda, György Rásonyi, Anna Kelemen, Vera Juhos, Péter Halász, Ken Mackie, Tamás F. Freund: Dynamic changes of CB1 receptor expression in hippocampi of epileptic mice and humans. *Epilepsia*, 51(Suppl. 39): 115-120, (2010)
- Mago A, Kekesi Adrienna K, Simor A, Toth K, Hunyadi-Gulyas E, Darula Z, Medzihradsky K, Freund T, Juhasz G, Maglóczy Z. Proteomic profiling of the hippocampus of epileptic mice with and without sclerosis. 10th EUROPEAN CONGRESS ON EPILEPTOLOGY, London, 30th September-04th October, 2012.
- Mullen SA, Carvill GL, Bellows S, Bayly MA, Trucks H, Lal D, Sander T, Berkovic SF, Dibbens LM, Scheffer IE, Mefford HC. Copy number variants are frequent in genetic generalized epilepsy with intellectual disability. *Neurology*. 2013 Oct 22;81(17):1507-14. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a95829. Epub 2013 Sep 25. Review. Erratum in: *Neurology*. 2013 Dec 10;81(24):2148.
- Mastrogiacomo, A., Parsons, S., Zampighi G., Jenden D., Umbach J., Gundersen C. (1994), Cysteine string protein: a potential link between synaptic vesicles and presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Science*, **263**, 981-982.
- Meeren, H. K.; Pijn, J. P.; Van Luijckelaar, E. L.; Coenen, A. M.; Lopes da Silva, F. H. (2002). Cortical Focus Drives Widespread Corticothalamic Networks during Spontaneous Absence Seizures in Rats. *The Journal of Neuroscience*, **22(4)**: 1480-1495.
- Micheletti, G.; Vergnes, M.; Marescaux, C.; Reis, J.; Depaulis, A.; Rumbach, L.; Warter, J. M. (1985). Antiepileptic drug evaluation in a new animal model: spontaneous petit mal epilepsy in the rat. *Arzneimittel-Forschung* **35**: 483-495.
- Midzianovskaia, I. S.; Kuznetsova, G. D.; Coenen, A. M.; Spiridonov, A. M.; Van Luijckelaar, E. L. (2001). Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats. *Brain research* **911**: 62-70.
- Ruiz-Montasell B., Aguado F., Majo G., Chapman E., Canals J., Marsal J., Blasi J. (1996), Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system. *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 2544-2552.
- Sariskova, K.; van Luijckelaar, G. (2011). The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **35**: 854-876.
- Ingrid E. Scheffer Diagnosis and long-term course of Dravet syndrome  
European Journal of Paediatric Neurology, Volume 16, Supplement 1, September 2012, Pages S5–S8
- Seress L. (2005). *Az emberi hippocampus makroszkópos anatómiája, szövettani szerkezete, külső és belső kapcsolatai és fejlődése*. In: Halász, P. (szerk.): Hippocampus, mint neuropszichiátriai betegségek közös nevezője. Melinda Kiadó, Budapest, 9-36.

- Sperk G, Schwarzer C, Tsunashima K, Kandlhofer S. Expression of GABA(A) receptor subunits in the hippocampus of the rat after kainic acid-induced seizures. *Epilepsy Res.* 1998 Sep;32(1-2):129-39.
- Spina, R. J.; Chi, M. M. Y.; Hopkins, M. G.; Nemeth, P. M.; Lowry, O. H.; Holloszy, J. O. (1996). Mitochondrial enzymes increase in muscle response to 7-10 days of cycle exercise. *J. Appl. Physiol.*, **80**, 2250-2254.
- Tóth E, Eröss L, Czirják2 Entz L, Vajda J, Rásonyi G, Halász P, Maglóczy Z. Changes in the Distribution of Citrate Synthase in Hippocampi of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. IBRO Workshop 2014, January 16-17. Debrecen
- Kinga Tóth, Loránd Eröss, János Vajda, Péter Halász, Tamás F. Freund and Zsófia Maglóczy: Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain*, 133; 2763-77 (2010)
- Tóth K, Drexel M, Faradz-Zade L, Eröss L, Vajda J, Halász P, Freund TF, Sperk G, Maglóczy Z. Alteration of the GABA-A receptor  $\alpha 1$  subunit expression in different types of interneurons of the human epileptic hippocampus. SFN, 9-13 of November, San Diego 2013
- Kinga Tóth and Zsófia Maglóczy The vulnerability of calretinin-containing hippocampal interneurons to temporal lobe epilepsy Published online Sep 29, 2014. doi: 10.3389/fnana.2014.00100, *Front Neuroanat.* 2014; 8: 100. p 1-12
- Van Luijtelaaar, E. L. and Coenen, A. M. (1986). Two types of electro-cortical paroxysms in an inbred strain of rats. *Neurosci Lett* **70**: 393-397.
- Vergnes, M.; Marescaux, C.; Micheletti, G.; Reis, J.; Depaulis, A.; Rumbach, L.; Warter, J. M. (1982). Spontaneous paroxysmal electro-clinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy. *Neurosci Lett* **33**: 97-101.
- Vergnes, M.; Marescaux, C.; Depaulis, A.; Micheletti, G.; Warter, J. M. (1986). Ontogeny of spontaneous petit mal-like seizures in Wistar rats. *Brain research* **30**: 85-87.
- Wiser O., Bennett M., Atlas D. (1996), Functional interaction of syntaxin and SNAP-25 with voltage-sensitive L-and N-type  $Ca^{2+}$  channels. *EMBO J.*, 15, 4100-4110.