

Análisis integral de mutaciones de TSC1 y TSC2, y fenotipo Correlaciones en 150 familias con esclerosis tuberosa

Alistair C. Jones, Magitha M. Shyamsundar, Meinir W. Thomas, Julie Maynard, Shelley Idziaszczyk, Susan Tomkins, Julian R. Sampson y Jeremy P. Cheadle

Instituto de Genética Médica, Facultad de Medicina de la Universidad de Gales, Cardiff

Resumen

Esclerosis tuberosa (TSC [MIM 191090 y MIM 191100]) es un trastorno autosómico dominante que se caracteriza por hamartomas en muchos órganos. Dos tercios de los casos son esporádicas y se cree que representan nuevas mutaciones. La TSC es causada por mutaciones que afectan a cualquiera de los presuntos genes supresores de tumores, TSC1 y TSC2. Ambos parecen funcionar como supresores de tumores, porque pérdida somática o mutación intragénica del correspondiente El alelo de tipo salvaje se observa en los hamartomas asociados. Aquí informamos del primer análisis exhaustivo de mutaciones de TSC1 y TSC2 en una cohorte de 150 TSC no relacionados Pacientes y sus familias, utilizando heterodúplex y SSCP Análisis de todos los exones codificantes y uso de gel de campo pulsado. electroforesis y análisis Southern blot convencional y PCR larga para detectar grandes reordenamientos. Se caracterizaron mutaciones en 120 (80%) de los 150 casos, afectando a TSC1 en 22 casos y a TSC2 en 98 casos. Las mutaciones de TSC1 estaban significativamente subrepresentadas en Casos esporádicos (). Veintidós pacientes tuvieron P .000185 Mutaciones sin sentido de TSC2 que se encontraron predominantemente en el dominio relacionado con GAP (ocho casos) y en un pequeña región codificada en los exones 16 y 17, entre los nucleótidos 1849 y 1859 (ocho casos), consistente con la presencia de residuos que realizan funciones clave en estos sitios. Por el contrario, se predijo que todas las mutaciones de TSC1 serían truncadas, en consonancia con una estructura o Función adaptadora de la proteína codificada. La discapacidad intelectual fue significativamente más frecuente en los pacientes con TSC2 esporádico. casos que en los casos esporádicos de TSC1 (). Estos P .0145 Los datos proporcionan la primera imagen representativa de la distribución y el espectro de mutaciones en el TSC1. y los loci TSC2 en TSC clínicamente comprobado y apoyo una diferencia en la gravedad de las enfermedades asociadas a TSC1 y TSC2 enfermedad.

Recibido el 4 de diciembre de 1998; aceptado para publicación el 25 de febrero de 1998. 1999; publicado electrónicamente el 7 de abril de 1999.

Dirección para correspondencia y reimpresiones: Dr. JR Sampson, Instituto de Genética Médica, Hospital Universitario de Gales, Cardiff CF4 4XN, Reino Unido. Correo electrónico: wmgjrs@cardiff.ac.uk

1999 por la Sociedad Americana de Genética Humana. Todos los derechos reservados. 0002-9297/99/6405-0009\$02.00

Introducción

Esclerosis tuberosa (TSC [MIM 191090 y MIM 191100]) es un trastorno caracterizado por hamartomatosis afectación de muchos órganos (Gomez 1988) y se estima que afecta a 1/10.000 nacidos vivos (Osborne et al. 1991). Se hereda como un rasgo autosómico dominante, pero entre el 60% y el 70% de los casos son esporádicos y se cree que representan nuevas mutaciones (Fleury et al. 1980; Sampson et al. 1989). El fenotipo es muy variable. El cerebro, La piel, los riñones y el corazón se ven afectados con frecuencia. pulmones, esqueleto, glándulas endocrinas y la mayoría de los demás órganos ocasionalmente (Gómez 1988). El diagnóstico tradicional ha se han basado en combinaciones de datos clínicos, radiológicos y signos histopatológicos; criterios para el diagnóstico definitivo Se han revisado recientemente y se han vuelto más estrictas que antes (Roach et al. 1998). Significativo y Las complicaciones médicas comunes incluyen la epilepsia (75%), discapacidad intelectual (50%) y problemas de conducta (incluido el autismo y el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, en el 40% de los niños). La penetrancia es muy alta. y los únicos casos de aparente no penetrancia reportados Después de una rigurosa evaluación clínica, estos hallazgos han sido refutados recientemente mediante análisis genético molecular (Young et al. 1998).

Se han identificado dos genes determinantes de TSC. clonación posicional: TSC1 en 9q34 (van Sleightenhorst et al. 1997) y TSC2 en 16p13.3 (cromosoma europeo 16 Consorcio de Esclerosis Tuberosa 1993). El análisis genético molecular de crecimientos hamartomatosos y malignos ocasionales de pacientes con esclerosis tuberosa ha pérdida revelada de heterocigosidad o truncamiento intragénico mutaciones que afectan al alelo de tipo salvaje correspondiente (Henske et al. 1996; Sepp et al. 1996; van Sleightenhorst et al. 1997), lo que indica que TSC1 y TSC2 actúan como promotores tumorales. Supresores, según la definición de Knudson (1971). Las propiedades supresoras de tumores de TSC2 se han demostrado directamente mediante la expresión transgénica en el gen Eker. rata, un modelo natural en el que el gen homólogo Tsc2 está mutado (Kobayashi et al. 1997). El mecanismos a través de los cuales TSC1 y TSC2 median El control del crecimiento celular se ha dilucidado solo parcialmente. Los exones 34-38 de TSC2 codifican una GTPasa-activada

Dominio relacionado con la proteína GAP que tiene un significado significativo homología con los GAP rap1GAP y Spa1 murino (Maheshwar et al. 1996). Tuberina, el producto de TSC2, posee una modesta actividad GAP para rap1 (Wienecke et al. 1995) y rab5 (Xiao et al. 1997). Estos miembros de la superfamilia Ras de GTPasas desempeña funciones en la mitogénesis (Altschuler y Ribeiro Neto, 1998), la diferenciación neuronal (York et al., 1998) y la fusión temprana de endosomas (Gorvel et al., 1991). La tuberina también parece desempeñar un papel. un papel tanto en la quinasa dependiente de ciclina (CDK) como en la regulación de la transición de la fase G0/G1 a la fase S durante El ciclo celular (Soucek et al., 1997) y la diferenciación neuronal (Soucek et al., 1998). Funciones celulares específicas Todavía no se han informado para la hamartina, el producto TSC1, pero se ha demostrado que la hamartina y la tuberina coinmunoprecipitan, interactúan en el sistema de dos híbridos de levadura y colocalizan en inmunofluorescencia (Plank et al. 1998; van Sleightenhorst et al. 1998), sugiriendo que el Las proteínas participan en al menos algunas vías comunes.

El análisis de mutaciones tanto de TSC1 como de TSC2 no ha Se ha informado previamente en una serie de pacientes con CET. El análisis exhaustivo del TSC2 se ha visto frustrado tanto por el tamaño como por la estructura del gen (es decir, 41 codificantes exones y 1 exón líder) y porque, hasta hace muy poco, no estaba disponible la secuencia genómica completa. Hay varios informes de casos únicos o de un número pequeño de casos. Mutaciones de TSC2 identificadas durante una evaluación incompleta del gen (Kumar et al. 1995a, 1995b, 1997; Vrtel et al. 1996; Jobert et al. 1997; Verhoef et al. 1998; Wang et al. 1998). Tres estudios han intentado un análisis más completo de TSC2. Wilson et al. (1996) han utilizado Análisis del polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) de productos de PCR de transcriptasa inversa para estudiar 30 probandos no relacionados y se han reportado nueve posibles mutaciones. Una mutación, DF1509, ha sido posteriormente... Se observó en controles no afectados y se cree que no es patógeno (Jones et al., 1997). La patogenicidad de varios cambios de sentido erróneo identificados en ese estudio permanece. Sin confirmar. van Bakel et al. (1997) han utilizado la prueba de truncamiento de proteínas para estudiar a 18 pacientes no relacionados y Se han identificado mutaciones truncantes en 5 de ellos. Au et al. (1998) han utilizado el análisis SSCP de todos los exones codificantes Estudiar 90 casos no relacionados y haber identificado 22 mutaciones potenciales. Además, se han realizado varios estudios. Compuesto por pacientes con CET y riñón poliquistico grave enfermedad, la mayoría de los cuales parecen tener una contigua Síndrome de delección genética que afecta a TSC2 y al tipo adyacente de enfermedad renal poliquistica autosómica dominante 1 gen, PKD1 (Brook-Carter et al. 1994; Longa et al. 1997; Sampson et al. 1997). Análisis del gen TSC1 ha demostrado ser más sencillo. La genómica completa La secuencia de TSC1 se estableció cuando el gen fue identificado. Es significativamente menos complejo que TSC2, Compuesto por 21 exones codificantes y 2 líderes. Al menos cinco Se han realizado estudios sistemáticos de las mutaciones de TSC1.

portado (Jones et al. 1997; Ali et al. 1998; Kwiatkowska et al. 1998; Joven y col. 1998; van Sleightenhorst et al., en prensa); todas las mutaciones TSC1 identificadas en sólo el 10% de casos esporádicos de CET. Por lo tanto, es evidente que anteriores Los estudios sobre la TSC no han logrado identificar la mayoría de las mutaciones causales.

Nos propusimos determinar la distribución y naturaleza de mutaciones de TSC1 y TSC2 en una serie amplia y representativa de pacientes y familias con CET. El conocimiento de estos parámetros es necesario tanto para el desarrollo de un diagnóstico molecular eficiente como para estudios de La relación genotipo-fenotipo. En estudios previos De esta cohorte de pacientes, hemos examinado todos los exones codificantes. del gen TSC1 y los exones 1, 25, 31, 34-39 y 41 del gen TSC2, y hemos buscado estudios a gran escala reordenamientos en los loci TSC1 y TSC2 (Jones et al. 1997; Maheshwar et al. 1997). Para obtener información completa datos, hemos completado el análisis SSCP y heteroduplex de todos los exones TSC2 y, mediante análisis Southern y PCR larga, hemos complementado nuestros datos anteriores. buscar grandes reordenamientos en ambos loci.

Pacientes y métodos

Pacientes

El estudio fue aprobado por el comité de ética de División de Medicina, Autoridad Sanitaria de South Glamorgan. Los casos índice comprendían 150 pacientes consecutivos con CET, no emparentados, que figuraban en el Instituto de Genética Médica de Cardiff antes de abril de 1994. y para quienes había muestras disponibles para un análisis exhaustivo Análisis de los genes TSC1 y TSC2. Pacientes seleccionados específicamente por nosotros para un estudio independiente de quistes renales. No se incluyeron las enfermedades en la CET (Sampson et al. 1997), pero nueve casos determinados por otras razones que fueron Se incluyeron pacientes que posteriormente presentaron riñones poliquisticos. Inicialmente, la serie comprendía 171 pacientes aparentemente no relacionados, pero 21 fueron excluidos, 7 porque... No cumplió con los criterios de diagnóstico recientemente revisados de TSC definido (Roach et al. 1998), 13 porque además Las muestras necesarias para completar el análisis no fueron disponible y, en un caso, porque previamente no se había reconocido el parentesco con otro caso índice que portaba el mismo Se identificó la mutación. Se consideró que había discapacidad intelectual cuando la evaluación formal del desarrollo reveló un cociente de desarrollo!70, cuando La educación convencional sin ayuda era imposible porque de discapacidad intelectual (no problemas de conducta), o cuando un adulto estaba institucionalizado o requería supervisión en la comunidad.

PCR

El ADN genómico se preparó a partir de sangre periférica. muestras mediante métodos estándar. Se des-

firmado con la ayuda del software “Oligo Analysis” Paquete (Wojciech Rychlik). Secuencias de cebadores y temperaturas de hibridación para la amplificación de todos los TSC1 y Exones codificantes de TSC2 y para PCR larga en TSC1 y Los loci TSC2 están disponibles en el sitio web de la base de datos de mutaciones de esclerosis tuberosa de Cardiff-Rotterdam. Estándar La PCR se realizó en volúmenes de reacción de 50 ml que contenían 100 ng de ADN genómico, 25 pmol de cada cebador, 0,2 mM dNTP, 5 ml de tampón de reacción (100 mM Tris pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl2, 0,01 % gelatina) y 1 U de la polimerasa AmpliTaq Gold (Cetus). Los parámetros de ciclado fueron 94 °C durante 10 min, seguidos de 32 o 33 ciclos. de 54 °C a 58 °C durante 1 min, 72 °C durante 1 min y 94 °C durante 30 s, y un paso final de 72 °C durante 10 min. PCR larga Se realizó en volúmenes de reacción de 50 ml que contenían 100 ng de ADN genómico, 4 pmol de cada cebador, 0,35 mM dNTP, 5 ml de tampón de reacción de Boehringer-Mannheim 3 (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 22,5 mM MgCl2, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,5 % [v/v] Tween 20, 0,5 % [v/v] Nonidet P40, 50% [v/v] glicerol) y 2 U de Polimerasa de plantilla larga expandida (Boehringer Mann-heim). Los parámetros de ciclado fueron 95 °C durante 2 min, seguidos de 28 ciclos de 65 °C durante 30 s, 68 °C durante 8 min, y 94 °C durante 30 s. Se incrementó el paso de elongación. por 20 s por cada ciclo después del ciclo 10.

Análisis SSCP y heterodúplex

La SSCP se realizó en 3 ml de producto de PCR diluido 1:10 con formaldehído que contiene 0,0125% de bromofenol azul y 0,75% Ficoll 400. Las muestras se desnaturalizaron a 94 °C durante 5 minutos, enfriado rápidamente en hielo y cargado tres veces (a intervalos de 2 horas) en una mejora de la detección de mutaciones Gel (MDE) (Flowgen). La electroforesis se realizó en 0,6 # Tris borato EDTA a 6 W durante 18 h a temperatura ambiente. El análisis de heterodúplex se realizó mezclando alícuotas de 5 ml de dos productos de PCR con 0,6 ml de 0,1 M EDTA, desnaturalizando a 94 °C durante 5 min y luego Enfriamiento lento a 37 °C. Un microlitro de electroforesis. Se añadió tinte (Hoefer) a cada una de las muestras, lo que Luego se cargaron cuatro veces (a intervalos de 1 hora) en un Gel MDE y funcionar a 4,5 W durante 15 h a temperatura ambiente. Se visualizaron productos en geles SSCP y heterodúplex. mediante tinción de plata, como se describe en otra parte (Jones et al. 1997).

Secuenciación de ADN

Productos de PCR de muestras que presentan bandas variantes Los patrones se secuenciaron mediante el kit de secuenciación de productos de PCR Sequen-ase o el kit de secuenciación cíclica Thermo-Sequenase (Amersham).

Análisis del Sur

El ADN genómico para el análisis Southern fue digerido con EcoRI, HindIII y BamHI, se sometieron a electroforesis y

borrado, como se describe en otra parte (Sampson et al. 1997), y se analizaron con los clones de ADNc TSC1 y TSC2 . Las muestras que produjeron patrones de restricción variantes se sometieron a un análisis de restricción adicional para caracterizar la Mutaciones implicadas. Productos generados por PCR larga. Los fragmentos de amplificación se transfirieron a Hybond N. Los exones amplificados se utilizaron como sondas para determinar cuáles se eliminaron. y que se conservaron en los cromosomas mutantes.

Análisis de microsatélites

Prueba de paternidad y maternidad biológica en Se evaluaron casos con mutaciones aparentemente de novo mediante repeticiones de microsatélites altamente polimórficas en los cromosomas 4 (D4S43), 6 (D6S250), 7 (D7S636), 15 (D15S945) y 16 (D16S665).

Nomenclatura de mutaciones

La nomenclatura de las mutaciones ha sido inconsistente en el Locus TSC2 , ya que la transcripción reportada inicialmente por el El Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 (1993) no contenía los nucleótidos correspondientes al exón 31, que está sujeto a empalme alternativo. (Maheshwar et al. 1996). Numeramos los nucleótidos de acuerdo con los ADNc TSC1 y TSC2 de longitud completa como en GenBank (números de acceso AF013168 y X75621, respectivamente) y las mutaciones se describieron según lo recomendado por el Comité Ad Hoc sobre Nomenclatura de Mutaciones (1996).

Resultados

Características de la muestra

De los 150 casos índice examinados exhaustivamente, Mutaciones TSC1 y TSC2 , 130 fueron esporádicas, 19 fueron clasificado como familiar (tener un padre afectado, con o sin sin otros familiares afectados) y 1 paciente se habían adoptado y el estado clínico del biológico Se desconocía el nombre de los padres. En el momento de la verificación, el número total de individuos afectados vivos en las 150 familias era 199, y las proporciones generales de casos esporádicos y familiares Los casos fueron del 65% y el 35%, respectivamente. Trece más Los casos se examinaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado. (PFGE) y mediante análisis SSCP y heterodúplex de exones codificantes de TSC1 pero, debido a muestras de ADN inadecuadas o degradadas, no se examinaron exhaustivamente para detectar mutaciones de TSC2.

Mutaciones en los loci TSC

Se caracterizaron las mutaciones que probablemente causan enfermedades en 120 (80%) de los 150 casos índice; de estas 120 mutaciones, 22 (18%) estaban en el locus TSC1 y 98 (82%) estaban en el locus TSC2 . En un estudio previo, habíamos... informaron todas menos una de las mutaciones de TSC1 (Jones et al.

En 1 de las 150 familias estudiadas, dos hermanos afectados
Tuvieron padres cuyos resultados fueron normales en el examen clínico.
La mutación TSC2 R905W (CrT en 2731) fue identificada

Tabla 2

Mutaciones sin sentido y deleciones en el marco de lectura de TSC2					
Exón del paciente	Mutación		Cambio de nucleótido	¿Tipo de mutación de novo?	
278	9	G294E	G899A	Sin sentido	Familiar
060	10	DI365	1111del3bp	Eliminación dentro del marco	Sí
098	16	R611Wa	C1849T	Sin sentido	No probado
208	16	R611W	C1849T	Sin sentido	No probado
217	16	R611W	C1849T	Sin sentido	Sí
032	16	R611Qb	G1850A	Sin sentido	Sí
123	16	R611Q	G1850A	Sin sentido	No probado
102	16	R611Q	G1850A	Sin sentido	No probado
353	16	R611Q	G1850A	Sin sentido	No probado
275	17	A614D	C1859A	Sin sentido	Sí
253	18	C696Y	G2105A	Sin sentido	No probado
362	23	R905Wb	C2731T	Sin sentido	Sí
220	33	P1497R	C4508G	Sin sentido	Sí
211	33	S1498N	G4511A	Sin sentido	Sí
306c	36	L1594M	C4798A	Sin sentido	Sí
367c	37	N1643K	C4947G	Sin sentido	Sí
276c	37	N1651S	A4970G	Sin sentido	Sí
084c	38	P1675L	C5042T	Sin sentido	No probado
241c	38	P1675L	C5042T	Sin sentido	No probado
247c	38	P1675L	C5042T	Sin sentido	No probado
302c	38	P1675L	C5042T	Sin sentido	Sí
223c	38	N1681K	C5061G	Sin sentido	Sí
311	40	5256del18bp	Delección de 18 pb 40	Eliminación dentro del marco	No probado
003	5256del18bp	Delección de 18 pb 40	5256del18bp	Eliminación dentro del marco	No probado
044	Delección de 18 pb	5256del18bp	Delección de 18 pb 40	Eliminación dentro del marco	Sí
360	pb 40			Eliminación dentro del marco	No probado
050	40	R1743P	G5246C	Sin sentido	No probado

a También informado por Wilson et al. (1996)
b También informado por Au et al. (1998) c
También informado por Maheshwar et al. (1997).

tificado en el caso índice, paciente 362, y en su afectado hermano, pero no se detectó en el ADN extraído de Leucocitos de cada uno de los progenitores. Resultado del análisis. de los cinco marcadores microsatélites fueron consistentes con la paternidad biológica, lo que sugiere la presencia, en uno de los padres, del mosaicismo que involucra la línea germinal para Esta mutación.

Polimorfismos

Se observaron treinta y nueve variantes de secuencia que probablemente representan polimorfismos no patógenos en el TSC2 locus, tanto en pacientes con CET como en controles normales o miembros de la familia TSC sin clínica ni radiografía Evidencia de TSC. Treinta de estos no han sido reportados. no se habían informado anteriormente y se enumeran en la tabla 4; incluyen nueve variantes sin sentido dentro de la región codificante. Se han informado polimorfismos de TSC1 en otros lugares. (Jones et al. 1997).

Discapacidad intelectual

La discapacidad intelectual estaba presente en 86 (57%) de los 150 casos índice y en 97 (49%) de los 199 afectados miembros de las 150 familias diferentes. Discapacidad intelectual

La capacidad era significativamente más común en los casos esporádicos portadores de mutaciones TSC2 (59 [67%] de 88 casos) que casos esporádicos portadores de mutaciones TSC1 (4 [31%] de 13 casos) (P .0145, prueba exacta de Fisher; odds ratio 4.5). La frecuencia de discapacidad intelectual en casos esporádicos con mutaciones de sentido erróneo de TSC2 o pequeñas mutaciones de delección en el marco (15 [68%] de 22 casos) no fue significativamente diferente de la de los casos esporádicos con otras clases de Mutaciones de TSC2 (44 [67%] de 66 casos) (P .506, Prueba exacta de Fisher).

Características somáticas inusuales

Se detectó enfermedad renal poliquística macroscópica en una ecografía (pero no fue la característica de presentación) en Nueve casos. Todos estos casos tenían mutaciones de TSC2 y, En seis casos, estas mutaciones fueron deleciones contiguas También afecta al gen PKD1 . Cuatro de los seis casos con deleciones de TSC2/PKD1 eran mosaicos somáticos. Dos Los casos tenían grandes deleciones intragénicas que afectaban a TSC2 y Un caso tuvo una inversión de 600 kb que interrumpió TSC2 (tabla 3) Todos los casos se han notificado en otros lugares (Europa Consorcio de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 1993; Brook-Carter y otros, 1994; Sampson y otros, 1997). Quince de los 22 casos índice con mutaciones TSC1 no tenían evidencia

Tabla 3

Grandes reordenamientos en el locus TSC2			
Paciente	Mutación	Método de Detección	Referencia
002	Deleción multigénica TSC2/OCTS3/OCTS2	PFGE	Jones et al. (1997)
019	intragénica ≈5 kb Deleción	Consortio de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 del Sur de Europa	(1993)
022	multigénica en mosaico TSC2/PKD1	PFGE	Sampson et al. (1997)
076	Deleción multigénica TSC2/OCTS3/OCTS2	PFGE	Consortio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 (1993)
0786	Deleción multigénica TSC2/OCTS3/OCTS2	PFGE	Brook-Carter et al. (1994)
080	Deleción multigénica TSC2/OCTS3/OCTS2	PFGE	Consortio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 (1993)
088	Deleción intragénica ≈10 kb	PFGE	Jones et al. (1997)
111	Deleción multigénica en mosaico TSC2/PKD1	PFGE	Sampson et al. (1997)
136	Deleción intragénica ≈4 kb (exones 17-20)	Estudio actual de PCR larga	
148	Deleción multigénica TSC2/OCTS3	Cromosoma 16 del Sur de Europa	Consortio de Esclerosis Tuberosa (1993)
179	Deleción multigénica TSC2/PKD1	PFGE	Cromosoma Europeo 16
180	Deleción intragénica ≈3 kb	Cromosoma 16 del sur de Europa	Consortio de Esclerosis Tuberosa (1993)
181	Deleción multigénica TSC2/OCTS2/OCTS3	PFGE	Cromosoma Europeo 16
206	Deleción intragénica ≈5 kb	Southern Jones et al. (1997)	
216	Deleción intragénica ≈1 kb (exones 37-38)	Southern Jones y otros (1997)	
270	Deleción multigénica en mosaico TSC2/PKD1	PFGE	Sampson et al. (1997)
277	Deleción intragénica ≈3 kb (exón 11, parte del exón 12)	PCR larga Estudio actual	
283	Deleción multigénica en mosaico TSC2/PKD1	PFGE	Sampson et al. (1997)
284	Deleción multigénica TSC2/PKD1	PFGE	Sampson et al. (1997)
308	Expansión de TSC2 y 3' UTR de PKD1	Southern Jones y otros (1997)	
346	Deleción intragénica ≈8 kb (exones 3–8)	Estudio de Presentación	
431	Deleción multigénica TSC2/OCTS3	PFGE	Sampson et al. (1997)

de quistes renales en la ecografía. Tres tenían quistes unilaterales. Quistes solitarios (a los 35, 50 y 64 años). Sin función renal. Se realizó ecografía en cuatro casos con TSC1 mutaciones.

Tres pacientes femeninas tenían antecedentes de neumotórax. y cambios quísticos o en panal en los pulmones. Investigación radiográfica, compatible con un diagnóstico de linfangioleiomiomatosis (LAM). Un caso, paciente 080, tenía una gran mutación por deleción que afectaba tanto al 5 extremos de TSC2 y los genes OCTS3 y OCTS2 , que Se encuentra inmediatamente 5 de TSC2. Otro caso, el paciente 208, tuvo el cambio de sentido erróneo recurrente TSC2 R611W. El El tercer caso, el paciente 256, tenía esclerosis ósea, con expansión de la clavícula derecha y asimetría que afectaba la lado derecho de la cara, además de cambios quísticos en el pulmón derecho. Este paciente era portador del gen sin sentido TSC1. cambio S334X. Todos estos casos fueron esporádicos.

Se observó un crecimiento excesivo localizado que afectaba las extremidades en tres pacientes mujeres, todas ellas con otras características Presentaba afectación multiorgánica típica. Mutaciones en TSC2. Se identificaron en el ADN extraído de sangre venosa en Dos de estos pacientes. Paciente 211, portador del de novo cambio de sentido erróneo S1498N, tuvo un crecimiento excesivo masivo de la pierna derecha, involucrando los huesos y tejidos blandos, que progresó durante la infancia y la niñez y que, en A los 30 años, le fue amputada la pierna. Paciente 046 Presentaba la deleción de una sola base 546delC y un sobrecrecimiento localizado en el meñique izquierdo. Sin mutación. Se identificó en el tercer caso, que tenía sobrecrecimiento

que afecta los huesos y tejidos blandos del antebrazo izquierdo y de los dedos medio y anular.

Discusión

Estudiamos a 150 individuos no relacionados con CET, como así como sus familiares. Las proporciones de familiares y casos esporádicos entre los 199 miembros afectados sus familias eran 35% y 65% respectivamente, y la La frecuencia global de discapacidad intelectual fue del 49%. Estas cifras son similares a las reportadas en grandes estudios epidemiológicos (Sampson et al. 1989; Osborne et al., 1991), lo que sugiere que la presente serie es representativa de casos de CET clínicamente confirmados. Se identificaron mutaciones en un total de 120 (80%) de estos pacientes; 98 Se demostró que (65,4%) tenían mutaciones en el TSC2 locus y 22 (14,6%) tenían mutaciones en el locus TSC1 . Se caracterizaron ciento una mutaciones diferentes (21 que afectan a TSC1 y 80 que afectan a TSC2), de los cuales 42 no se habían descrito previamente. Las mutaciones fueron No identificado en 1 de 19 casos familiares ni en 29 de 130 casos esporádicos. Estudios recientes han demostrado que los somáticos El mosaicismo puede ser un hallazgo frecuente entre los esporádicos. Casos de CET (Sampson et al., 1997). Los análisis SSCP y heterodúplex utilizados para el cribado de exones en este estudio Es poco probable que hayan tenido la sensibilidad suficiente para detectar mosaicismo de bajo nivel y también tienen una sensibilidad limitada en la detección de algunas mutaciones no mosaicas. Estos factores, así como nuestra evaluación incompleta de

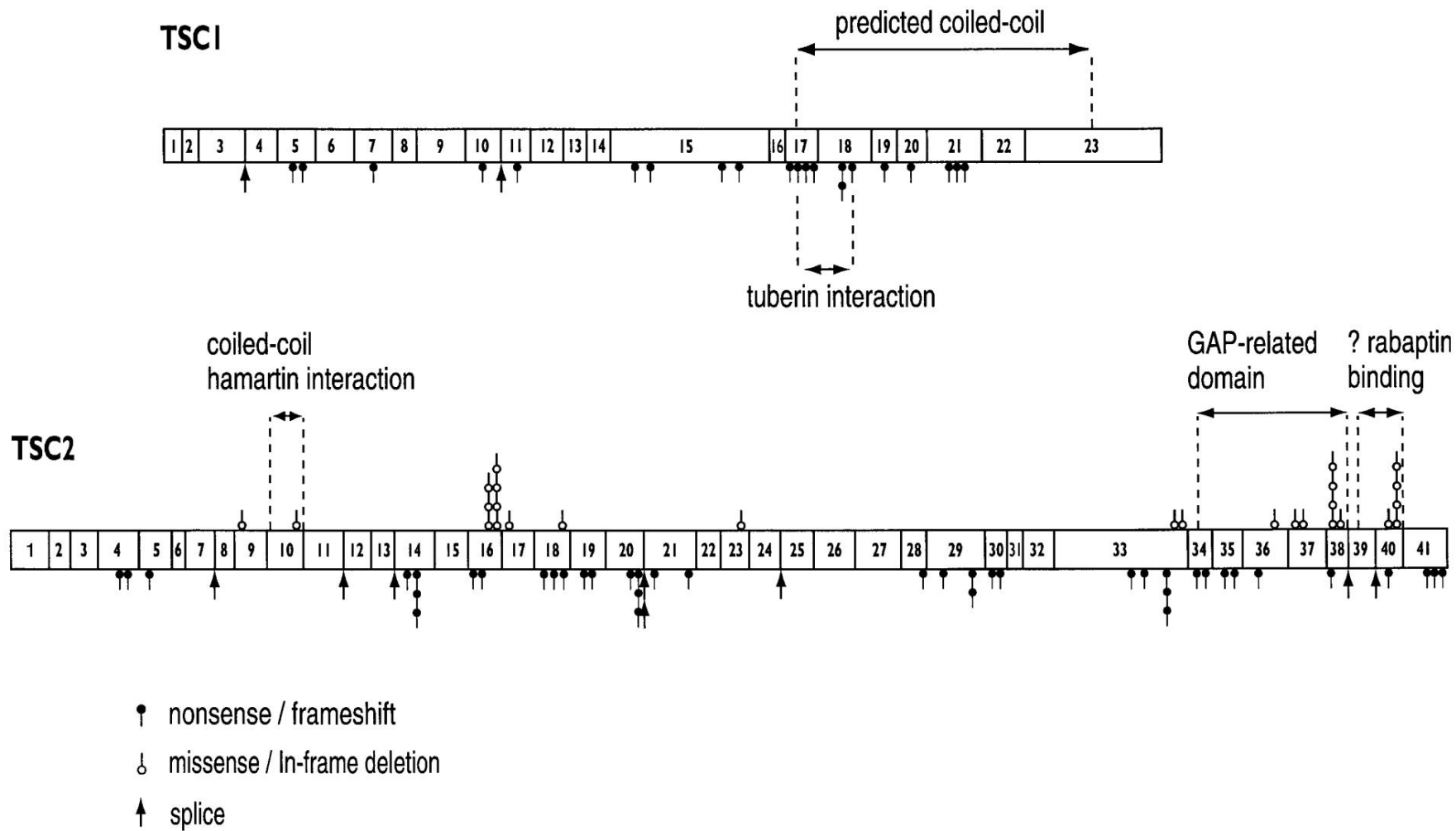


Figura 1 Distribución de mutaciones puntuales y pequeñas deleciones e inserciones en los genes TSC1 y TSC2 . Los recuadros numerados indican exones individuales.

Tabla 4

Polimorfismos dentro del gen TSC2			
Ubicación	Polimorfismo	Nucleótido Cambiar	Frecuencia
Intrón 3	35431CrT	C35431T Único	
Exón 4	L160V	C496G Único	
Intrón 4	5003CrT	C5003T 5%–10%	
Intrón 4	5007CCrAA	CC5007AA Único	
Exón 8	R261W	C799T Único	
Exón 9	M286V	A874G 15%	
Exón 10	R367Q A1128G	G1118A	15%
P378L Único	Exón 10 Q370 C1151T	Exón 11	15%
Exón 12	G440S G1336A Único		
Exón 13	G459 C1395T Único		
Exón 13	I463V A1405G Único		
Intrón 14	161814CrT C161814T	5%–10%	
Intrón 14	161839CrT C161839T	5%–10%	
Intrón 15	173516CrT C173516T	Único	
Exón 16	A583T G1765A	15%	
Exón 18	P677 C2049T Único		
Intrón 18	211535GrA G211535A	Único	
Intrón 22	265744CrG C265744G	15%	
Intrón 31	390178GrA G390178A	5%–10%	
Intrón 31	390251CrG C390251G	15%	
Intron 31	390255ArT A390255T	Único	
Exón 33	D1436 C4326T Único		
Intrón 35	468143GrA G468143A	Único	
Intrón 39	51799ArC A51799C	5%–10%	
Intrón 39	517926delTGAG	Delección de 4 pb	15%
Intron 40	527773CrT C527773T	Único	
Intron 40	527780CrT C527780T	Único	
Exón 41	G1791S G5389A	Único	
3 UTR	5503delAA	Eliminación de 2 pb	15%

Las secuencias intrónicas y reguladoras probablemente sean responsables de nuestra No se detectan mutaciones en el 20% de los casos. Además

La heterogeneidad del locus en TSC también sigue siendo una teoría. posibilidad.

Descubrimos que significativamente más casos esporádicos tenían mutaciones TSC2 que TSC1 . Esto sería Se esperaba que la tasa de mutación de la línea germinal en el locus TSC2 fueron más altos que en el locus TSC1 . Sin embargo, adicionalmente También se esperarían casos familiares de TSC2 , y lo hicimos. no observa esto; ni tiene un exceso significativo de familias sin ligamiento a TSC1 se ha observado en estudios de ligamiento (Sampson et al. 1991; Povey et al. 1994). Una posible explicación del aparente exceso de mutaciones TSC2 entre los casos esporádicos, pero no entre los casos familiares, Se observó una mayor gravedad general de la enfermedad asociada a TSC2. Se evaluó la frecuencia de discapacidad intelectual. En casos esporádicos, como un aspecto confiable e importante de gravedad de la enfermedad. A diferencia de muchos otros componentes de la fenotipo que muestra una penetrancia dependiente de la edad, la discapacidad intelectual en la TSC está presente casi invariablemente desde la primera infancia y rara vez escapa a la detección. Nosotros Se encontró que la discapacidad intelectual era significativamente más frecuente entre los casos esporádicos con mutaciones TSC2 que entre los

entre aquellos con mutaciones TSC1 . Si la presencia o La ausencia de discapacidad intelectual está relacionada, en parte, con la frecuencia de mutaciones de “segundo golpe” en el cerebro en desarrollo, entonces nuestras observaciones podrían reflejar una tasa de mutación somática más alta en el locus TSC2 que en el locus TSC1 . Alternativamente, la tuberina puede servir roles en el SNC que no son compartidos por hamartin. En otros estudios hemos demostrado que la mayoría de los pacientes con La TSC y la enfermedad renal poliústica grave tienen delecciones contiguas que involucran a TSC2 y al gen adyacente de la enfermedad renal poliústica 1 (PKD1) (Brook-Carter et al. 1994; Sampson et al. 1997). La presente serie no Incluye casos determinados específicamente debido a la enfermedad renal poliústica, pero la enfermedad renal poliústica fue identificado en 9 de los 150 casos índice. Seis de estos casos Tenían delecciones TSC2-PKD1 , de las cuales cuatro eran mosaicos. Eliminación de TSC2 y sólo de los 3 UTR de PKD1 Se encontró en otro caso que no tenía poliústosis. Riñones. Tres casos con riñones poliústicos tenían TSC2. mutaciones que no involucraban PKD1. Quistes solitarios— pero no riñones poliústicos—se observaron en algunos pacientes con mutaciones en TSC1 . Estudio específico de una cohorte más amplia. Se requiere un análisis de pacientes para determinar si La enfermedad TSC1 conlleva un riesgo de enfermedad renal clínicamente significativa. enfermedad ústica. La enfermedad pulmonar ústica sintomática que se presentó como neumotórax fue una característica en tres casos en el presente estudio. Serie. Dos pacientes con mutaciones TSC2 presentaron una apariencia generalizada en panal en ambos pulmones que fue típico de LAM, y el tercero, con una mutación TSC1 , Tenía cambios ústicos marcados en el lóbulo superior derecho. Pulmón. El LAM es un trastorno que se observa casi exclusivamente en mujeres y se caracteriza por infiltración del músculo liso bronquiolar y cambios ústicos en el parénquima pulmonar. Esto suele asociarse con angiomiolipoma. de los riñones y/o de los ganglios linfáticos abdominales e hiliares. Se estima que la LAM sintomática ocurre en aproximadamente 1/millón de la población, sin otra evidencia de TSC, pero en varios porcentajes de mujeres con CET , lo que implica un papel de los genes TSC en la etiología de LAM. Pérdida de Se ha demostrado heterocigosidad para los marcadores en la región TSC2. observado en angiomiolipomas renales y ganglios linfáticos Extraído de mujeres con LAM pero sin otros signos de TSC (Smolarek et al. 1998), pero mutaciones de Los genes TSC no se habían informado previamente en pacientes con LAM asociada a TSC o esporádica. JUSTICIA. Estudios de otros componentes del fenotipo TSC en Ahora se requieren enfermedades asociadas a TSC1 y TSC2, En particular, para cuantificar la frecuencia y la gravedad de complicaciones. Dados nuestros hallazgos en relación con la distribución de las mutaciones TSC1 y TSC2 en pacientes esporádicos y casos familiares, así como la probabilidad de que los casos familiares Se verán menos afectados que los casos esporádicos, como Los estudios tendrán que basarse en casos esporádicos o

poblaciones epidemiológicamente completas, o lo harán deben emplearse correcciones válidas para el sesgo de verificación.

La gran proporción de mutaciones de TSC2, a diferencia de Las mutaciones de TSC1 que observamos en la TSC confirmada médicamente tienen implicaciones para el desarrollo de diagnóstico molecular. No solo el gen TSC2, en su estructura, sustancialmente más compleja que la TSC1 gen, pero también hemos encontrado su espectro mutacional ser más diversos. Varios estudios han encontrado la gran La mayoría de las mutaciones de la línea germinal en el locus TSC1 son pequeñas lesiones truncadas (Jones et al. 1997; Ali et al. 1998; Kwiatkowska et al. 1998; Joven y col. 1998; furgoneta Slegthenhorst et al., en prensa). Por el contrario, ahora tenemos Se ha demostrado que, en el locus TSC2, se producen cambios sin sentido, grandes Los reordenamientos incluyen delecciones de genes completos, mutaciones sin sentido y pequeñas inserciones y delecciones. representadas en frecuencias similares. La sensibilidad de cualquier Por lo tanto, es probable que el único enfoque disponible actualmente para la detección de mutaciones en el locus TSC2 sea limitado. Sin embargo, observamos ocho mutaciones de TSC2 de forma recurrente, al menos tres de las cuales (R505X, R611W y Otros investigadores también han informado sobre la presencia de R611Q. (Wilson et al. 1996; van den Ouweland et al. 1997; Au et al. 1998). Siete de las mutaciones observadas de forma recurrente fueron debido a sustituciones de CrT o GrA en dinucleótidos CpG y es probable que resulten de una desaminación espontánea de citosinas metiladas en el ADN genómico. La delección de TSC2 en marco, 5256del18 pb, se identificó en Cuatro casos esporádicos no relacionados. Se trata de una repetición directa. de 11 nucleótidos y los 7 nucleótidos intermedios y es probable que sea el resultado de un desajuste durante replicación (Cooper y Krawczak, 1993). Varios TSC1 También se han observado mutaciones de forma recurrente (Jones et al. 1997; van Slegthenhorst et al. 1997 y en prensa; Ali y Alabama. 1998; Kwiatkowska et al. 1998; Joven y col. 1998), lo que sugiere que el ensayo para una pequeña cantidad de TSC2 y Las mutaciones de TSC1 podrían proporcionar una evaluación inicial útil en El entorno de diagnóstico.

Nuestra caracterización de un número significativo de mutaciones sin sentido y algunas pequeñas delecciones en el marco de lectura en

Es probable que el locus TSC2 sea útil en la investigación de las funciones putativas del producto génico. Los efectos que los cambios de sentido erróneo en el dominio relacionado con GAP tienen actividad GAP hacia rap1 y rab5 ahora

Se está investigando, al igual que el efecto que el residuo único tiene La delección DI365 afecta la unión de la hamartina con la tuberina. Mutantes naturales de este tipo podrían resultar útiles para... Determinación de cuál de las funciones de la tuberina requiere la unión a la hamartina. La delección recurrente de 18-p en el exón 40 de TSC2 se encuentra dentro del supuesto dominio de unión a rabaptina (Xiao et al., 1997). Sin embargo, Demostración de la unión de la rabaptina a la tuberina espera confirmación independiente y el patógeno El mecanismo de esta mutación no está claro en la actualidad. y otros (Wilson et al. 1996; van den Ouweland et

al. 1997; Au et al. 1998) han identificado mutaciones recurrentes de sentido erróneo en un tramo corto de solo 11 nucleótidos (1849-1859) de TSC2.

Esta región no

corresponden a cualquier dominio funcional actualmente reconocido de la tuberina, pero los efectos que estas mutaciones tienen

sobre las funciones recientemente propuestas de la tuberina, incluida la regulación de la transición de la fase G0/G1 a S (Soucek et al. 1997),

Ahora se puede evaluar. Por el contrario, a pesar de los informes de grandes Número de cambios de una sola base y pequeñas eliminaciones y inserciones en el locus TSC1, no se han descrito mutaciones de sentido erróneo claramente patógenas y parece

Es probable que la pérdida completa de hamartina (en lugar de una alteración más sutil de funciones específicas) sea habitual en la enfermedad asociada a TSC1.

Nota añadida en la prueba.—Dado que este artículo fue aceptado Para su publicación, se han identificado mutaciones en tres Otros casos esporádicos, todos en el locus TSC2. Estos fueron (i) una delección intragénica de 5 kb en el paciente 165 (identificado por PCR larga), (ii) una delección de 34 pb de un gen de 34 Repetición en tándem de bp que abarca el exón 38/intrón 38 límite en el paciente 112 (se ha detectado la misma mutación) reportado en otro lugar, en un paciente diferente con TSC [Beauchamp et al. 1998]), y (iii) una delección del exón 41 y el 3 UTR de TSC2 y parte del 3 UTR de PKD1 en el paciente 115 (identificado por PCR larga).

Expresiones de gratitud

D. Kwiatkowski y S. Dabora ayudaron en el desarrollo de Reactivos para PCR larga. P. Thompson, N. Thomas y C. Daniels proporcionaron ayuda técnica, y M. Krawczak, D. Cooper, y R. Snell brindaron asesoramiento y asistencia estadística. La asistencia con la determinación clínica fue proporcionada particularmente por J. Osborne, C. Moss, C. Kingswood, M. Super, C. Shepherd, y S. Mossman. El trabajo fue financiado con subvenciones de la Plan Galés para el Desarrollo de la Investigación Social y Sanitaria, la Asociación de Esclerosis Tuberosa (Gran Bretaña), la Asociación Nacional de Esclerosis Tuberosa y el Consejo de Investigación Médica.

Información de bases de datos electrónicas

Los números de acceso y las URL de los datos de este artículo son los siguientes: Sigue:

Base de datos de mutaciones de la esclerosis tuberosa de Cardiff-Rotterdam, http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/tsc_db/pcrpub.html (para Cebadores y condiciones de PCR) GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank> (para ADNc de TSC1 y TSC2 [AF013168 y X75621, respectivamente] y secuencia de TSC2 [AC005600])

Referencias

Actualización del Comité Ad Hoc sobre Nomenclatura de Mutaciones (1996) sobre la nomenclatura de las mutaciones genéticas humanas. Hum Mutat 8:197–202

Ali JBM, Sepp T, Ward S, Green AJ, Yates JRW (1998) Las mutaciones en el gen TSC1 son responsables de una minoría de pacientes con esclerosis tuberosa. *J Med Genet* 35:969–972. Altschuler DL, Ribeiro Neto F (1998) Propiedades mitogénicas y oncogénicas de la proteína G pequeña rap1b. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7475–7479.

Au KS, Rodriguez JA, Finch JL, Volcik KA, Roach ES, Del-gado MR, Rodriguez E Jr, et al (1998) Análisis mutacional de la línea germinal del gen TSC2 en 90 pacientes con esclerosis tuberosa. *Am J Hum Genet* 62:286–294

Beauchamp RL, Banwell A, McNamara P, Jacobsen M, Hig-gins E, Northrup H, Short P, et al. (1998) Escaneo exónico del gen TSC2 completo para mutaciones germinales en 40 pacientes no emparentados con esclerosis tuberosa. *Hum Mutat* 12:408–416. Brook-Carter P, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar M, Nellist M, et al. (1994) Deleción de los genes TSC2 y PKD1 asociada con la enfermedad renal poliquística infantil grave: un síndrome de genes contiguos. *Nat Genet* 8:328–332.

Cooper DN, Krawczak M (eds) (1993) Mutación genética humana. Bios Scientific Publishers, Oxford

Consorcio Europeo de Esclerosis Tuberosa del Cromosoma 16 (1993) Identificación y caracterización del gen de la esclerosis tuberosa en el cromosoma 16. *Cell* 75:1305–1315. Fleury P, de Groot WP, Delleman JW, Verbeeten B, Franken-molen-Witkiezwicz IM (1980) Esclerosis tuberosa: incidencia de casos familiares frente a esporádicos. *Brain Dev* 2:107–117. Gomez MR (ed.) (1988) Esclerosis tuberosa, 2.ª ed. Raven Press.

Nueva York

Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) Rab5 controla la fusión temprana de endosomas in vitro. *Cell* 64:915–925 Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, van Slegtenhorst M, et al (1996) La pérdida alélica es frecuente en lesiones renales de esclerosis tuberosa, pero rara en lesiones cerebrales. *Am J Hum Genet* 59:400–406 Jobert S, Bragado-Nilsson E, Samolyk D, Pedespan JM, Marchal C, Reichert S, Mallet J, et al (1997) Deleción de 11 aminoácidos en la tuberina asociada con fenotipos graves de esclerosis tuberosa: evidencia de un nuevo dominio esencial en el primer tercio de la proteína. *Eur J Hum Genet* 5:280–287 Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszczyk SA, Krawczak M, Sampson JR, et al. (1997) El análisis genético y fenotípico molecular revela diferencias entre la esclerosis tuberosa familiar y esporádica asociada a TSC1 y TSC2. *Hum Mol Genet* 6:2155–2161

Knudson AG (1971) Mutación y cáncer: estudio estadístico del retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820–823 Kobayashi T, Mitani H,

Takahashi RI, Hirabayashi M, Ueda M, Tamura H, Hino O (1997) Rescate transgénico de la letalidad embrionaria y la carcinogénesis renal en el modelo de rata Eker mediante la introducción de un transgén TSC2 salvaje. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 94:3990–3993

Kumar A, Kandt RS, Wolpert C, Roses AD, Pericak-Vance MA, Gilbert JR (1995a) Análisis de mutaciones del gen TSC2 en una familia afroamericana. *Hum Mol Genet* 4: 2295–2298

Kumar A, Kandt RS, Wolpert C, Roses AD, Pericak-Vance MA, Gilbert JR (1997) Una nueva mutación en el sitio de empalme (1561GrA) en el gen TSC2. *Hum Mutat* 9:64–65 Kumar A, Wolpert C, Kandt RS, Segal J, Pufky J, Rosed AD.

Pericak-Vance MA, et al (1995b) Una mutación de novo por desplazamiento del marco de lectura en el gen de la tuberina. *Hum Mol Genet* 4:1471–1472. Kwiatkowska J, Jozwiak S, Hall F, Henske EP, Haines JL, McNamara P, Brasier J, et al (1998) Análisis mutacional exhaustivo del gen TSC1: observaciones sobre la frecuencia de mutación, características asociadas y no penetrancia. *Ann Hum Genet* 62:277–285

Longa L, Scolari F, Brusco A, Carbonara C, Polidoro S, Val-zorio B, Riegler P, et al. (1997) Una deleción importante de los genes TSC2 y PKD1 se asocia con signos renales y extrarrenales de enfermedad renal poliquística autosómica dominante. *Nephrol Dial Transplant* 12:1900–1907

Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR (1997) El dominio GAP de la tuberina, producto del gen TSC2, es una diana para mutaciones de sentido erróneo en la esclerosis tuberosa. *Hum Mol Genet* 6: 1991–1997

Maheshwar MM, Sandford R, Nellist M, Cheadle JP, Sgotto B, Vaudin M, Sampson JR (1996) Análisis comparativo y estructura genómica del gen de la esclerosis tuberosa 2 (TSC2) en humanos y peces globo. *Hum Mol Genet* 5:131–137 Osborne JP, Fryer A, Webb D (1991) Epidemiología de la esclerosis tuberosa Esclerosis múltiple. *Ann NY Acad Sci* 615:125–127

Plank TL, Yeung RS, Henske EP (1998) La hamartina, producto del gen de la esclerosis tuberosa (TSC1), interactúa con la tuberina y parece estar localizada en vesículas citoplasmáticas. *Cancer Res* 58:4766–4770

Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah SJ, Franklin D, et al. (1994) Dos loci para la esclerosis tuberosa: uno en 9q34 y otro en 16p13. *Ann Hum Genet* 58: 107–127

Roach ES, Gomez MR, Northrup H (1998) Conferencia de consenso sobre esclerosis tuberosa: criterios revisados de diagnóstico clínico. *J Child Neurol* 13:624–628 Sampson JR,

Janssen LAJ, Sandkuijl LA, Tuberous Sclerosis Collaborative Group (1992) Investigación de ligamiento de tres supuestos loci determinantes de esclerosis tuberosa en los cromosomas 9q, 11q y 12q. *J Med Genet* 29:861–866 Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, et al (1997) Enfermedad quística renal en la esclerosis tuberosa: papel del gen 1 de la enfermedad renal poliquística. *Am J Hum Genet* 61:843–851 Sampson JR, Scahill SJ, Stephenson JBP, Mann L, Connor JM (1989). Aspectos genéticos de la esclerosis tuberosa en el oeste de Escocia. *J Med Genet* 26:28–31

Sepp T, Green AJ, Yates JRW (1996) Pérdida de heterocigosidad en hamartomas de esclerosis tuberosa. *J Med Genet* 33:962–964. Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP (1998) Evidencia de que la linfangiomatosis es causada por mutaciones en TSC2 : pérdida de heterocigosidad del cromosoma 16p13 en angiomiolipomas y ganglios linfáticos de mujeres con linfangiomatosis. *Am J Hum Genet* 62:810–815.

Soucek T, Holzl G, Bernaschek G, Hengstschlager M (1998) Función del producto del gen 2 de la esclerosis tuberosa durante la diferenciación neuronal. *Oncogene* 16:2197–2204. Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, Hengstschlager M (1997). Función del producto del gen 2 de la esclerosis tuberosa en el control del ciclo celular. *J Biol Chem* 272:29301–29308. van Bakel I, Sepp T, Ward S, Yates JRW, Green AJ (1997).

- Mutaciones en el gen TSC2: análisis de la secuencia codificante completa mediante la prueba de truncamiento de proteínas (PTT). *Hum Mol Genet* 6:1409–1414
- van den Ouweland AMW, Tempelaars A, Ariyurek Y, Wang Q, Hermans CJ, Nellist M, Bakker PLG, et al (1997) Identificación de un punto de acceso mutacional en el gen TSC2. *Am J Hum Genet Suppl* 61:A349 van Slegtenhorst M, deHoogt R, Hermans C, Nellist M, Jans-sen B, Verhoef S, Lindhout D, et al (1997) Identificación del gen de la esclerosis tuberosa TSC1 en el cromosoma 9q34. *Ciencia* 277:805–808
- van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle J, Snell R, van den Ouweland A, Reuser A, et al (1998) Interacción entre hamartina y tuberina, los productos genéticos TSC1 y TSC2. *Hum Mol Genet* 7:1053-1057
- van Slegtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A, Bakker L, Wang Q, Wessels M, Bakker R, et al. Espectro mutacional del gen TSC1 en una cohorte de 225 pacientes con complejo de esclerosis tuberosa: no hay evidencia de una correlación genotipo-fenotipo. *J Med Genet* (en prensa)
- Verhoef S, Vrtel R, Bakker L, Stolte Dijkstra I, Nellist M, Begeer JH, Zaremba J, et al. (1998) Mutación recurrente 4882delTT en el dominio GAP del gen TSC2 de la esclerosis tuberosa. *Hum Mutat Suppl* 1:S85–S87. Vrtel R, Verhoef S, Bouman K, Maheshwar MM, Nellist M, van Essen AJ, Bakker PLG, et al. (1996) Identificación de una mutación sin sentido en el extremo 5 del gen TSC2 en una familia.
- con diagnóstico presuntivo de esclerosis tuberosa. *J Med Genet* 33:47–51
- Wang Q, Verhoef S, Tempelaars AMP, Bakker PLG, Vrtel R, Hesselting-Janssen ALW, Nellist M, et al. (1998) Identificación de una gran inserción y dos nuevas mutaciones puntuales (3671de18 y S1221X) en pacientes con complejo de esclerosis tuberosa (CET). *Hum Mutat* 11:331–332
- Wienecke R, König A, DeClue JE (1995) Identificación de la tuberina, producto de la esclerosis tuberosa tipo 2, que posee actividad específica de rap1GAP. *J Biol Chem* 270:16409–16414. Wilson PJ, Ramesh V, Kristiansen Kowski DJ, Short MP, et al. , Bove C, Jozwiak S, Kwiat- (1996) Nuevas mutaciones detectadas en el gen TSC2 en pacientes con CET esporádica y familiar. *Hum Mol Genet* 5:249–256.
- Xiao GH, Shoarinejad F, Jin F, Golemis EA, Yeung RS (1997). El producto del gen de la esclerosis tuberosa 2 funciona como una proteína activadora de la GTPasa rab5a (GAP) en la modulación de la endocitosis. *J Biol Chem* 272:6097–6100 York
- RD, Yao H, Dillon T, Ellig CL, Eckert SP, McCleskey EW, Stork PJS (1998) Rap1 media la activación sostenida de la quinasa MAP inducida por el factor de crecimiento nervioso. *Nature* 392:622–626
- Young JM, Burley MW, Jeremiah SJ, Jeganathan R, Ekong R, Osborne JP, Povey S (1998) Un análisis de mutaciones del gen TSC1 revela 26 mutaciones de truncamiento de proteínas y 1 mutación en el sitio de empalme en un panel de 79 pacientes con esclerosis tuberosa. *Ann Hum Genet* 62:203–215