

Molekulargenetische Diagnostik bei tuberöser Sklerose (TSC): Erfahrungen mit dem Protein-Truncation-Test (PTT)

Karin Mayer und Hans-Dieter Rott
Institut für Humangenetik der Universität Erlangen

Schlüsselwörter

Tuberöse Sklerose (TSC),
TSC1, TSC2,
molekulargenetische Diagnostik:
Protein Truncation Test (PTT)

Key words

Tuberous sclerosis (TSC),
TSC1, TSC2,
molecular genetic diagnostics:
Protein Truncation Test (PTT)

Zusammenfassung

Für die Tuberöse Sklerose (TSC) sind zwei Genorte bekannt: TSC1 auf Chromosom 9q34 und TSC2 auf 16p13. Beide Gene codieren Tumorsuppressorproteine. Die Suche nach krankheitsverursachenden Mutationen hat gezeigt, daß in beiden Genen fast alle Arten von genetischen Veränderungen vorkommen, die jeweils über die gesamten codierenden Regionen verteilt sind, jedoch der überwiegende Teil aller Mutationen zu einem vorzeitigen Translationsstop führt. Daher bietet sich der Protein Truncation Test (PTT) als Screening-Verfahren zur Mutationssuche an, eine Methode, die auf der kombinierten in-vitro-Transkription und Translation von Abschnitten der kodierenden DNA und der anschließenden elektrophoretischen Auftrennung der Translationsprodukte beruht. Dieses Verfahren ist speziell für die Erfassung von Stopmutationen geeignet, die entweder durch Basenaustausche neu eingeführt werden, oder durch kleinere Deletionen, Insertionen, und Spleißmutationen durch die Verschiebung des Leserahs entstehen können.

Für die Diagnostik bei der tuberösen Sklerose (TSC) wurde aus peripheren B-Lymphozyten zunächst eine permanente B-Zelllinie angelegt, und anschließend die gesamte codierende Region des TSC1- und des TSC2-Gens in vier bzw. sechs überlappenden RT-PCR-Abschnitten untersucht. Insgesamt wurden 28 sporadische Patienten und 2 Patienten aus Familien mit mehreren Betroffenen untersucht, bei denen die TSC klinisch gesichert

war. Polypeptide, die aufgrund ihres veränderten Laufverhaltens auf translationale Stopmutationen hinwiesen, fielen im PTT des TSC1-Gens bei sechs Patienten und im PTT des TSC2-Gens bei acht Patienten auf. Die anschließende Analyse der Mutationen im TSC2-Gen ergab drei Nonsense- und zwei Spleiß-Mutationen; die Sequenzierung der TSC1-Fragmente lieferte eine Nonsensmutation, eine Insertion und eine Spleißmutation; bei den restlichen, im PTT auffälligen Fragmenten ist die Sequenzanalyse noch nicht abgeschlossen. Unsere Erfahrung zeigt, daß der PTT eine effiziente Methode zur Detektion von translationalen Stopmutationen im TSC1- und TSC2-Gen darstellt, die durch weitere Methoden der Mutationssuche wie SSCP und DGGE zur Steigerung der Erfassungsrate ergänzt werden kann.

Abstract

Tuberous sclerosis (TSC) is genetically heterogeneous with two known gene loci on chromosomes 9q34 (TSC1) and 16p13 (TSC2), respectively. Both genes are coding for tumour suppressor proteins. The analysis for disease causing mutations has shown that nearly all types of genetic changes are represented in both genes and distributed over the entire coding regions. The majority of mutations induce a premature translational stop. The protein truncation test (PTT) is a suitable screening method for the detection of such truncating mutations. It is based on the combination of in vitro transcription and translation of parts of the coding

DNA and the subsequent electrophoretic separation of the translation products. This technique is especially suitable for the detection of stop mutations which originate from single nucleotide exchanges, or are a consequence of small deletions, insertions and splice mutations which change the reading frame. For the molecular diagnostics in TSC patients, a permanent cell line was first established from B lymphocytes. Subsequently, the entire coding regions of both the TSC1 and the TSC2 gene were screened for mutations by investigation of four and six partially overlapping RT-PCR products, respectively. A total of 28 sporadic patients and two members of multiplex families all with clinically proven TSC were studied. The PTT revealed polypeptides with an abnormal migration pattern indicating a translational stop in the TSC1 gene in six patients and in the TSC2 gene in eight patients. Subsequent analysis of the TSC2 mutations revealed three nonsense and two splice mutations; sequencing of the TSC1 fragments showed one nonsense mutation, one insertion and one splice mutation; for the remaining predicted mutations sequence analysis has still to be completed.

According to our experience, PTT is an efficient method for the detection of translational stop mutations within the TSC1 and the TSC2 gene. The effectivity of mutation detection will be increased by subsequently including SSCP and DGGE as additional methods.

Tabelle 1: Zusammenstellung wichtiger Struktureigenschaften der beiden TSC-Gene

	TSC1-Gen	TSC2-Gen
Chromosomale Lokalisation	9q34	16p13
DNA-Region	40 kb	43 kb
Exons	23	41
Transkript	8,6 kb 21 codierende Exons Exon 1 und 2 5'UTR 3,5 kb codierende Region	5,5 kb 41 codierende Exons Exon 25 und 31 alternativ gespleißt 5,4 kb codierende Region
Protein	Hamartin 1164 Aminosäuren 130 kD N-terminale Transmembran-Domäne C-terminale coiled coil Domäne	Tuberin 1784 Aminosäuren 180 kD Potentielle katalytische Domäne am C-Terminus mit Rap1GAP-Homologie

1. Einleitung

Für die tuberöse Sklerose (TSC), einer dominanten Erkrankung, die fast alle Gewebe und Organsysteme betreffen kann, sind zwei krankheitsverursachende Genorte bekannt: TSC1 auf Chromosom 9q34 und TSC2 auf Chromosom 16p13. Die ursprünglich auf den Chromosomen 11 und 12 vermuteten Loci konnten dagegen nicht bestätigt werden (McKusick; 1998). Klinisch ließen sich beide TSC-Typen bisher nicht voneinander unterscheiden. Bei familiären Fällen ist in 50% ein Defekt im TSC1-Gen und zu 50% ein TSC2-Genedefekt die Ursache für die Erkrankung. 70% aller Fälle sind sporadisch. Das TSC2 Gen wurde 1993 zwei Jahre nach seiner Lokalisation durch Positionsklonierung isoliert (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993). Zur Identifizierung hatten verschiedene größere Deletionen in der Kandidatenregion beigetragen, bei denen die Krankheit gekoppelt an Marker auf 16p vererbt wurde.

Im Fall des TSC1-Gens vergingen dagegen von der Lokalisation im Jahre 1987 bis zur Identifizierung im August 1997 zehn Jahre (The TSC1 Consortium, 1997). Die Kandidatenregion konnte durch die Auswertung von Rekombinationsereignissen nur auf 4 cM eingeeengt werden, danach kam man wegen fehlender Patienten mit nachgewiesenen größeren Deletionen oder sonstigen Strukturanomalien in der Kandidatenregion nicht weiter, und war gezwungen, diesen Bereich von etwa 900 kb komplett zu klonieren. Die systematische Genanalyse und komplette Sequenzierung dieser Region

führte zur Lokalisierung und Identifizierung von 13 neuen Genen, unter denen sich offensichtlich auch das gesuchte TSC1-Gen befinden mußte. Der nächste Schritt war die abschnittsweise Mutationssuche in allen exprimierten Sequenzen innerhalb der klonierten TSC1-Kandidatenregion bei 60 TSC-Patienten, darunter 20 TSC-Familien mit offensichtlicher Kopplung an 9q. Einer dieser Abschnitte zeigte eine auffällige Häufung von DNA-Veränderungen in zehn der untersuchten Patienten, darunter waren acht Familien bei denen die Mutation gekoppelt vererbt wurde. Nach Einordnung dieses Exonabschnitts in den Kontext eines kompletten Gens war damit das TSC1-Gen identifiziert.

Diese Entdeckung eröffnet die Möglichkeit der molekulargenetischen Diagnostik an beiden TSC-Genorten. Ziel dieses Angebots für die Betreuung betroffener Familien ist es, bei Risikopersonen die krankheitsverursachende Mutation nachzuweisen oder auszuschließen, und bei Risikoschwangerschaften eine Pränataldiagnostik anzubieten.

Die folgende Arbeit gibt eine Übersicht über die Struktur der beiden TSC-Gene, über Art und Verteilung der bisher gefundenen Mutationen und über die Möglichkeiten und Grenzen der molekulargenetischen Diagnostik.

2. Struktur und Funktion von TSC1- und TSC2-Gen

Einzelheiten sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Beide TSC-Gene überspannen eine genomische Region von etwa 40 kb. Die codierende Region bei TSC1 setzt sich aus 21 Exons zusam-

men, unter denen sich ein auffallend großes Exon 15 befindet, dessen Anteil an der Gesamtlänge 15% beträgt. Im Gegensatz dazu variieren die 41 codierenden TSC2-Exons, von denen Exon 25 und 31 alternativ gespleißt werden, in ihrer Länge kaum. Die beiden TSC-Proteine Hamartin und Tuberin, die in nahezu allen Geweben exprimiert werden, weisen keinerlei Ähnlichkeiten miteinander auf. Während man bei Tuberin bereits eine potentiell funktionelle Domäne am C-Terminus mit struktureller und funktioneller Homologie zu dem GTPase-aktivierenden Protein Rap1, einem Mitglied der Ras-Superfamilie, identifiziert hat (Wienecke et al., 1995; Soucek et al., 1997), weist Hamartin keine Homologien zu bekannten Wirbeltierproteinen auf. Über die Funktion seiner N-terminalen Transmembrandomäne sowie der C-terminalen coiled coil Domäne ist noch nichts bekannt.

Beide TSC-Gene wirken als Suppressorgene. Dafür sprechen neben dem autosomal dominanten Erbgang und dem klinischen Bild auch die mehrfache Beobachtung des „Loss of heterozygosity (LOH)“ in Tumoren von TSC-Patienten, der für beide Genorte nachgewiesen wurde (Sepp et al., 1996). Man vermutet, daß beide TSC-Proteine Teil eines gemeinsamen Signalübertragungswegs von der Zellmembran zum Kern sind, der in Zellwachstum und Differenzierung eingreift.

3. Mutationsanalysen

Die Veröffentlichung der Sequenzinformation des TSC1-Gens hat dazu geführt, daß verschiedene Labors in

Abbildung 1:
 Art und Verteilung
 der Mutationen
 im TSC1-Gen.
 A: Zusammenstellung
 der bekannten Mutatio-
 nen (nach The Human
 Gene Mutation Database
 Cardiff; 3; 8; 15)
 B: Schematische Dar-
 stellung der für den PTT
 eingesetzten RT-PCR-
 Produkte und der Lokali-
 sation der identifizierten
 bzw. vermuteten Mutatio-
 nen (durch Pfeile darge-
 stellt)

den vergangenen Monaten die Mutationssuche auf beide Genorte ausgedehnt haben, so daß vor allem bei TSC1 laufend neue Mutationen bekannt werden. Inzwischen sind auf internationaler Ebene sowohl im TSC1-Gen als auch im TSC2-Gen über 60 verschiedene Mutationen identifiziert worden, so daß ein Vergleich der Art und Verteilung der Mutationen möglich ist (Abb.1A und 2A). Große Deletionen oder DNA-Umlagerungen, die weite Teile des Gens, zum Teil das gesamte Gen oder auch angrenzende DNA-Regionen betreffen, wurden bisher nur bei TSC2 gefunden (The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, 1993; Brook-Carter et al., 1994; Au et al., 1997). Bei TSC1 wird als Ursache für das Fehlen derartiger Deletionen vermutet, daß infolge der hohen Gendichte auf 9q34 bei größeren DNA-Verlusten eher benachbarte Gene inaktiviert werden, was pränatal letal wirken könnte. Ansonsten zeigt sich in beiden Genen ein ähnliches Spektrum von Mutationen, meistens kleine Deletionen, Insertionen, Nonsense-Mutationen und Spleißmutationen, die zum größten Teil infolge einer Leserasterverschiebung zum vorzeitigen Translationsstop führen. Interessanterweise sind bei TSC1 im Gegensatz zu TSC2 bisher fast keine Missense-Mutationen gefunden worden. Die identifizierten Punktmutationen sind sowohl bei TSC1 als auch bei TSC2 über das gesamte Gen verteilt. Die scheinbare Häufung von Mutationen im C-terminalen Bereich des TSC2-Gens rührt von einer bevorzugten Untersuchung dieses Abschnitts her, der die potenti-

ell funktionelle Domäne enthält (Maheshwar et al., 1997). Demgegenüber scheint der Bereich der Exons 15-22 des TSC1-Gens, der die coiled coil Domäne enthält, tatsächlich besonders häufig von Mutationen betroffen zu sein. Hier lassen sich aus dem Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen anhand verschiedenen Patientenguts mehrere „Hot Spots“ ableiten. Die Identifizierung des TSC1-Gens konnte bestätigen, daß bei familiären TSC-Fällen in 50% TSC1-Mutationen und in 50% TSC2-Mutationen für die Krankheit verantwortlich sind. Bei sporadischen Erkrankungen, die mit 65-70% den weitaus größeren Teil ausmachen, hat die bisherige Suche nach Veränderungen in beiden TSC-Genen ergeben, daß TSC1-Mutationen hier nur zu 10-20% die Ursache der TSC sind, und TSC2-Mutationen wohl den größeren Anteil der Neuerkrankungen ausmachen. Als Ursache für diese Ungleichverteilung wird diskutiert, daß TSC1-Mutationen einen weniger schweren klinischen Phänotyp zur Folge haben und sich günstiger auf die „biologische Fitness“ auswirken als TSC2-Mutationen (Jones et al., 1997). Insgesamt handelt es sich bei über 60% aller bekannten TSC2-Mutationen und sogar mehr als 90% aller TSC1-Mutationen um translationale Stopmutationen, die zu einem vorzeitig verkürzten TSC-Protein und somit sehr wahrscheinlich zum Funktionsverlust führen. Diese funktionsinaktivierenden Mutationen untermauern die Tumorsuppressornatur von TSC1 und TSC2.

4. Eigene Untersuchungen

4.1 Methoden

Aufgrund der Häufigkeit von translationalen Stopmutationen in beiden TSC-Genen wurde in unserem Labor der Protein Truncation Test (PTT) (Roest et al., 1993) als vorrangiges Verfahren zur Mutationssuche etabliert. Das Prinzip dieser Methode ist die kombinierte in-vitro-Transkription und Translation von Abschnitten der kodierenden DNA und die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Translationsprodukte. Dieses Verfahren erfaßt sowohl alle Basensubstitutionen, die neue Stopcodons einführen (Nonsense-Mutationen), als auch Deletionen, Insertionen oder Spleißmutationen, die als Folge einer Leserasterverschiebung zu einem verkürzten, in Ausnahmefällen auch einem verlängerten Protein führen. Aus der Länge dieses bei heterozygoten Merkmalsträgern zusätzlichen Polypeptids läßt sich auf die ungefähre Lokalisation der Mutation rückschließen, so daß meist nur ein kurzer Abschnitt sequenziert werden muß, um die Mutation genau zu identifizieren. Für die Mutationssuche in beiden TSC-Genen wird der PTT wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt:

1. Anlegen einer permanenten Zelllinie aus B-Lymphozyten mittels EBV-Transformation.
2. Isolierung von Gesamt-RNA aus den kultivierten Zellen und Gewinnung von cDNA mittels reverser Transkription.

Abb nur in der Druckversion

Abbildung 2:
 Art und Verteilung der Mutationen TSC2-Gen.
 A: Zusammenstellung der bekannten Mutationen (nach The Human Gene Mutation Database Cardiff; 3; 8; 15)
 B: Schematische Darstellung der für den PTT eingesetzten RT-PCR-Produkte und der Lokalisation der identifizierten bzw. vermuteten Mutationen (durch Pfeile dargestellt)

3. Amplifikation der gesamten codierenden Region

a) von 3,5 kb des TSC1-Gens in 4 teilweise überlappenden Abschnitten,

b) von 5,5 kb des TSC2-Gens in 6 teilweise überlappenden Abschnitten, durch RT-PCR (siehe Abb.1B und 2B).

4. In vitro Transkription/Translation der RT-PCR-Produkte in einem Retikulytenlysats-System unter Einbau von ³⁵S markiertem Methionin.

5. Auftrennung der radioaktiv markierten Polypeptide durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und anschließende Autoradiographie.

6. Beim Auftreten einer zusätzlichen Proteinbande mit verändertem Laufverhalten wird das entsprechende RT-PCR-Produkt kloniert, und beide Allele zur Identifizierung der Mutation getrennt sequenziert. Zur Verifizierung einer auf diese Weise detektierten Mutation wird schließlich der entsprechende Abschnitt auf cDNA-Ebene und auf genomischer Ebene ebenfalls sequenziert.

4.2 Ergebnisse

Mit der beschriebenen Methode wurden bisher insgesamt 28 sporadische Fälle sowie zwei Familien mit klinisch gesicherter TSC untersucht. Zunächst wurde der PTT für das TSC2-Gen etabliert, und das gesamte Patientenmaterial auf translationale Stopmutationen im TSC2-Gen untersucht. Nach Veröffentlichung der TSC1-Sequenzen konnte die Scree-

ning-Methode auf den zweiten TSC-Locus ausgedehnt werden. Nach sequentiellem Test aller 6 TSC2 RT-PCR-Fragmente und anschließend aller 4 TSC1 RT-PCR-Fragmente fielen im PTT bei TSC2 acht und bei TSC1 sechs zusätzliche Polypeptide durch ihr verändertes Laufverhalten im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Protein auf (Beispiele Abb. 3). Die Sequenzanalyse ergab im TSC2-Gen drei Nonsense-Mutationen, bei denen es sich jeweils um C T Transitionen handelt: R505X im Exon 14, Q732X im Exon 19 und R1138X im Exon 29 (vgl. Abb. 3B), sowie zwei Spleißmutationen, wobei in einem Fall Exon 10 und im anderen Fall die Exons 12 und 13 deletiert werden. Bei der Sequenzierung der TSC1-Fragmente wurde eine Nonsense-Mutation R245X im Exon 8, eine Insertion 2502insTACA im Exon 18 und eine Spleißmutation identifiziert, die zur Deletion von Exon 16 führt (vgl. Abb. 3A). Abgesehen von R505X im TSC2-Gen, die bereits beschrieben wurde (Wilson et al., 1996) handelt es sich um neue TSC2- und TSC1-Mutationen. Für jeweils drei auffällige TSC1- und TSC2-Fragmente ist die Sequenzanalyse noch nicht abgeschlossen. Die identifizierten TSC1- und TSC2-Mutationen sowie die Zuordnung der anhand aberranter Proteinbanden vermuteten Mutationen (jeweils zwei unterschiedliche zwischen Exon 3–9 und eine zwischen Exon 19–23 im TSC1-Gen, sowie eine zwischen Exon 1–8, bzw. 31–33, bzw. 35–41 im TSC2-Gen) sind in unserem Patientengut über die gesamten codierenden Regionen der beiden Gene verteilt (vgl. Abb.1B und 2B).

5. Diskussion

Nach wie vor ist die SSCP-Analyse die am häufigsten angewandte Methode zur molekulargenetischen TSC-Diagnostik, zum Teil in Kombination mit der Heteroduplex-Analyse. Einige der veröffentlichten TSC-Mutationen wurden auch durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten identifiziert. Southern-Blot-Hybridisierung, Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) und FISH werden nur beim TSC2-Gen eingesetzt, und spielen hier wegen der geringen geschätzten Häufigkeit von großen Deletionen bzw. DNA-Rearrangierungen von weniger als 5% nur eine untergeordnete Rolle. Während das Ausgangsmaterial für die o.g. Verfahren in der Regel genomische DNA ist, handelt es sich beim PTT um eine RNA- bzw. cDNA-abhängige Methode. Das bietet den Vorteil, daß mit wenigen Amplifikationen der gesamte codierende Bereich der beiden TSC-Gene untersucht werden kann, während bei den anderen Verfahren jedes der 21 codierenden TSC1-Exons bzw. der 41 codierenden TSC2-Exons einzeln getestet werden muß. Mit Kenntnis der Häufigkeit translationaler Stopmutationen, für deren Detektion der PTT bevorzugt geeignet ist, wird es sowohl für die Suche von TSC2-Mutationen mit 60% bekannter Stopmutationen, und noch mehr für die Suche von TSC1-Mutationen mit über 90% identifizierter Stopmutationen sinnvoll, den PTT als vorrangige Screening-Methode anzuwenden. Zur Zeit wird der PTT zur Mutationsuche bei TSC im europäischen Raum außer in Erlangen von der Arbeitsgruppe um Andrew Green (früher Cambridge, Großbrit-

Die Patienten T2, T25 und T16 weisen eine zusätzliche Polypeptidbande auf m. Die den aberranten Proteinbanden zugrundeliegenden Mutationen sind: bei T2 eine Spleißmutation im TSC1-Gen, die zur Deletion von Exon 16, und zur Leserasterverschiebung führt; bei T25 eine Insertion TACAim Exon 18 des TSC1-Gens, die ebenfalls das Leseraster verschiebt; bei T16 eine Nonsense-Mutation im Exon 29 des TSC2-Gens.

tannien; jetzt Dublin, Irland) und einem Labor in Turin, Italien angewandt. Erste Ergebnisse mit dem PTT bei TSC2 wurden im September 1997 in England veröffentlicht (van Bakel et al., 1997). Die Arbeitsgruppe untersuchte 18 TSC-Patienten, und detektierte 5 aberrante TSC2-Fragmente im PTT, was einer Erfassungsrate von 28% entspricht. In unserem Patientenmaterial, das überwiegend aus sporadischen Fällen mit zwei Familien ohne bekannte Kopplung bestand, wurde als erstes das TSC2-Gen untersucht, was zur Identifizierung von 8 aberranten Fragmenten bei 30 verschiedenen Proben führte, die Erfassungsrate lag hier bei 27%. Die verbleibenden 22 Patienten ohne Auffälligkeiten im TSC2-Gen wurden anschließend auf TSC1-Mutationen untersucht, wobei 6 aberrante Fragmente im PTT auffielen, was ebenfalls einer Effizienz von 27% entspricht. Insgesamt liegt unsere Erfassungsrate von TSC1- und TSC2-Mutationen nach Anwendung des PTT bisher bei

47% bei insgesamt 32 untersuchten Patienten mit 30 zu erwartenden Mutationen.

Die Grenzen des PTT zeigen sich bei translationalen Stopmutationen, die zu instabilen Transkripten führen können, einem Phänomen, das bei anderen Genen bereits beschrieben ist (Muhlrad and Parker, 1994; Zhang et al., 1995), und obwohl es bei TSC1 und TSC2 bisher nicht beobachtet wurde, nicht ausgeschlossen werden kann. Ein weiteres Problem können Stopmutationen bieten, die nah am 5' Ende der einzelnen RT-PCR-Fragmente oder an den Grenzen der überlappenden Bereiche liegen und dann mit dem PTT nicht erfaßt werden können, wenn daraus sehr kurze Peptide oder Proteine mit nur geringem Größenunterschied zum Wildtyp translatiert werden. Solche methodischen Schwierigkeiten können jedoch durch eine veränderte Wahl der zu testenden RT-PCR-Produkte umgangen werden, was allerdings einen Mehraufwand bedeutet. Insgesamt erweist sich der

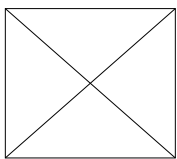
PTT als geeignete Methode, um ein relativ schnelles und effizientes Vorscreening auf TSC1- und TSC2-Mutationen durchzuführen, und im Anschluß bei Bedarf auf weitere Mutationsdetektionsmethoden überzugehen.

6. Danksagung

Unser Projekt wurde zunächst von der Selbsthilfegruppe Tuberöse Sklerose Deutschland e.V. unterstützt und wird seit 1997 von der Deutschen Krebshilfe gefördert. Beiden Organisationen gilt unser Dank. Außerdem danken wir Frau Silke Schirdewahn für ihre technische Assistenz.

Literatur

1. Au K-S, Rodriguez JA, Rodriguez Jr E, Doby-na WB, Delgado MR, and Northrup H (1997). Mutations and polymorphisms in the tuberous sclerosis complex Gene on Chromosome 16. Hum Mutation 9:23-29
2. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar M, Nellist M, Gamble V, Harris PC, and Sampson JR (1994) Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with



Kostengünstige Totalsequenzierung und Sequenzierung einzelner Exons

CFTR – Gen (Mukoviszidose), Dystrophin – Gen, Calpain – Gen (Duchenne/ Becker-Muskeldystrophie), BRCA1 – Gen (Brust-und Eierstockkrebs), MLH1/ MSH2 – Gene (nicht polypöse Form des kolorektalen Karzinoms) u. a.

AGOWA GmbH D-12489 Berlin, Glienicke Weg 185, Tel. 49 30 67057238, Fax: 49 30 67057228
E-mail: wambutt@agowa.de, Internet: <http://www.agowa.de/>

Besuchen Sie unseren Stand auf der 10. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik 25.-28.03.98 in Jena

- severe infantile polycystic kidney disease - a contiguous gene syndrome. *Nature Genet* 8: 328-332
3. Green AJ, Ali JBM, Sepp T, Yates JRW (1997) Mutation Detection in the TSC1 gene. *Am J Hum Genet* 61(4): A334
 4. Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszczyk SA, Krawczak M, Sampson JR, and Cheadle JP (1997). Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6:2155-2161
 5. Maheshwar MM, Cheadle, JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, and Sampson JR (1997). The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6: 1991-1996
 6. Mc Kusick V (1998) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/>
 7. Muhlrad D and Parker R (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 370:578-581.
 8. Povey S, Burley MW, Young J, Jeremiah SJ, Jeganathan D, Ekong R, Fox M, and Osborne J (1997) Mutation screening for TSC1 in UK families with tuberous sclerosis provides an explanation for an apparent case of non-penetrance. *Am J Hum Genet* 61(4): A344
 9. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, van Ommen G-JB, den Dunnen JT (1993) Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum. Mol. Genet* 2: 1719-1721
 10. Sepp T, Green AJ, and Yates JRW (1996). Loss of heterozygosity in tuberous sclerosis hamartomas. *J Med Genet* 33: 962-964.
 11. Soucek T, Pusch O, Wienecke R, DeClue JE, and Hengstschlager M (1997). Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. Loss of the tuberous sclerosis gene-2 induces quiescent cells to enter S phase. *J Biol Chem* 272: 29301-29308
 12. The European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium (1993): Identification and characterisation of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75: 1305-1315
 13. The TSC1 Consortium (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277: 805-808
 14. Van Bakel I, Sepp T, Ward S, Yates JRW, Green AJ (1997). Mutations in the TSC2 gene: analysis of the complete coding sequence using the protein truncation test. *Hum Mol Genet* 6:1409-1414
 15. Van den Ouweland AMW, Tempelaars A, Ariyurek Y, Wang Q, Hermans CJ, Nellist M, Bakker PLG, Lindhout D, Verhoef S, and Halley DJJ (1997) Identification of a mutational hot spot in the TSC2 gene. *Am J Hum Genet* 61(4): A349
 16. Wienecke R, König A, and DeClue JE (1995) Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. *J Biol Chem* 270:16409-16414
 17. Wilson PJ, Ramesh V, Kristiansen A, Bove C, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ, Short MP, and Haines JL (1996) Novel mutations detected in the TSC2 gene from both sporadic and familial TSC patients. *Hum Mol Genet* 5: 249-256
 18. Zhang S, Ruiz-Echevarria MJ, Quan J, and Peltz SW (1995). Identification and characterization of a sequence motif involved in nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 12: 2231-2244.

Korrespondenzadresse

Dr. Karin Mayer
 Institut für Humangenetik
 Schwabachanlage 10
 91054 Erlangen
 Tel. 09131/85-2332
 Fax 09131/209297
 Email: kmayer@humgenet.uni-erlangen.de