

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein

**Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Tuberöse-  
Sklerose-Komplex:**

***Auswertung der Mutationsanalyse von TSC1 und TSC2  
aus der Diagnostik von TSC-Patienten und  
Vergleich unterschiedlicher Techniken***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Maria Anna Katharina Schmid  
aus Landshut  
2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Joachim-Ulrich Walther
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Reiner Frank
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Karin Mayer
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	12.01.2017

## Eidesstattliche Versicherung

Schmid, Maria Anna Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

"Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Tuberöse-Sklerose-Komplex: Auswertung der Mutationsanalyse von TSC1 und TSC2 aus der Diagnostik von TSC-Patienten und Vergleich unterschiedlicher Techniken"

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Passau, den 29.01.2017

Maria Schmid

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Grundlagen.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Genetik.....	1
1.1.2	Krankheitsbild und -verlauf.....	2
1.1.2.1	Manifestationen im Zentralnervensystem.....	2
1.1.2.2	Hautmanifestationen.....	3
1.1.2.3	Nierenbeteiligung.....	5
1.1.2.4	Augenbeteiligung.....	6
1.1.2.5	Kardiovaskuläres System.....	6
1.1.2.6	Lungenbeteiligung.....	7
1.1.2.7	Zähne und Zahnfleisch.....	7
1.1.2.8	Weitere Manifestationen.....	8
1.1.3	Molekulare Grundlagen.....	8
1.1.3.1	Die Gene TSC1 und TSC2.....	8
1.1.3.2	Funktion der Proteine Tuberin und Hamartin.....	9
1.1.3.3	Zwei-treffer-theorie und Mosaik.....	11
1.1.3.4	Mutationsspektrum.....	11
1.1.3.5	Genotyp-Phänotyp-Korrelation - Bisherige Ergebnisse.....	13
1.1.4	Diagnostik.....	14
1.1.4.1	Klinische Diagnose anhand Haupt-und Nebenkriterien.....	14
1.1.4.2	Molekulargenetische Diagnostik.....	17
1.1.5	Therapiemöglichkeiten.....	18
1.1.5.1	Symptomatische Therapie.....	20
1.1.5.2	Einsatz von mTOR-Inhibitoren.....	20
1.2	Fragestellung.....	21
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Patientenkollektiv und Betrachtungszeitraum.....	22

2.2	Datenakquirierung.....	23
2.2.1	Ethikantrag und Einverständniserklärung .....	23
2.2.2	Daten aus Routinediagnostik .....	23
2.2.3	Vorgehen bei fehlenden klinischen Daten .....	23
2.3	Verwendete molekulargenetische Methoden .....	24
2.4	Erhobene Parameter .....	27
2.5	Auswertungen .....	28
2.5.1	Definition des Phänotyps .....	28
2.5.2	Definition des Genotyps .....	29
2.5.3	Statistische Methoden .....	29
3	Ergebnisse .....	30
3.1	Allgemeine Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	30
3.2	Genotypische Beschreibung des Kollektivs.....	32
3.2.1	Mutation identifiziert (MI), Mutation nicht identifiziert (NMI), <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i> .....	32
3.2.2	Unklassifizierte Varianten .....	33
3.2.3	Identifizierte Mutationstypen .....	34
3.2.4	Mutationsverteilung über die Exons des <i>TSC1</i> - und <i>TSC2</i> -Gens .....	39
3.2.5	Ausgewählte Mutationen.....	40
3.2.6	Überblick über die Resultate der verwendeten molekulargenetischen Methoden .....	40
3.3	Phänotypische Beschreibung des Kollektivs .....	42
3.3.1	Zentralnervöse Symptome .....	43
3.3.2	Dermatologische Symptome .....	43
3.3.3	Nephrologische Symptome .....	43
3.3.4	Kardiale Symptome und Lungenbeteiligung .....	43
3.3.5	Übrige Diagnosekriterien .....	43
3.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelation.....	44
3.4.1	Männliche versus weibliche Patienten.....	44
3.4.2	Sporadisch entstandene Mutation versus familiäres Auftreten .....	47

3.4.3	Abhängigkeit des Phänotyps vom betroffenen Gen .....	48
3.4.4	Effekte des Mutationstyps auf den Phänotyp.....	49
3.4.5	Patienten mit identifizierter Mutation versus ohne nachweisbare Mutation .....	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Kritische Betrachtung der Methode.....	54
4.2	Betrachtung der Ergebnisse .....	55
4.2.1	Allgemeine Ergebnisse .....	55
4.2.2	Auswertung der verwendeten Methoden .....	55
4.2.3	Einfluss des Geschlechts auf den klinischen Phänotyp .....	56
4.2.4	Zusammenhang des Stammbaums (familiär vs. sporadisch) auf den Phänotyp.....	57
4.2.5	Effekt des mutierten Gens auf den Phänotyp .....	58
4.2.6	Einfluss des Mutationstyps auf den Phänotyp .....	59
4.2.7	Phänotypische Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne identifizierte Mutation sowie Überlegungen zur Ursache von "NMI" .....	60
4.3	Konsequenzen und Ausblick.....	61
5	Zusammenfassung.....	62
6	Abkürzungsverzeichnis .....	65
7	Anhang .....	67
7.1	Standardisierter Fragebogen zu klinischen Diagnosekriterien.....	67
7.2	Patienteninformationen und Einwilligungserklärungen .....	69
7.3	Noch nicht publizierte Mutationen in <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i> .....	77
8	Abbildungsverzeichnis.....	80
9	Tabellenverzeichnis .....	81
10	Literaturverzeichnis.....	82
11	Danksagung .....	88

# 1 EINLEITUNG

Der "Tuberöse Sklerose Komplex" (TSC, Tuberos Sclerosis Complex) bietet ein vielfältiges Krankheitsbild mit unterschiedlich schwerwiegenden Ausprägungen von leichten, kaum beeinträchtigenden Hautmanifestationen, bis hin zu einer Multiorganerkrankung mit schwerer psychomotorischer Retardierung.

Es handelt sich um eine genetische, autosomal-dominant vererbte Erkrankung, bedingt durch Mutationen in einem der beiden Gene *TSC1* oder *TSC2*, die sich auf den Chromosomen 9 beziehungsweise 16 (9q34, 16p13.3) befinden.

Gemeinsam mit dem Von-Hippel-Lindau-Syndrom und der Neurofibromatose Typ 1 zählt sie zu der Gruppe der Phakomatosen oder Neurokutanen Syndrome. Charakteristisch ist die Ausbildung multipler Hamartome (gutartige Tumoren des Keimgewebes), die in allen Organen auftreten können.

Erste Dokumentationen der Erkrankung reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. In Deutschland wird sie auch Morbus Bournville-Pringle genannt, nach zwei ihrer Beschreiber; dem französischen Neurologen Bournville, der erstmals 1880 die neurologischen Symptome des TSC detailliert beschrieb und dem schottischen Dermatologen Pringle, der die fazialen Angiofibrome, damals noch fälschlich Adenoma sebaceum genannt, im englischsprachigen Raum als erster erwähnte [9, 77].

Auch deutsche Ärzte machten sich um die frühe klinische Erforschung des TSC verdient. So erkannte Vogt 1908 als erster, dass viele der bis dahin eigenständig beschriebenen Symptome zu dem einen Krankheitsbild der Tuberösen Sklerose zusammengefasst werden müssen und definierte die Symptomentrias zerebrale Krampfanfälle, geistige Behinderung und Adenoma sebaceum (Vogt'sche Trias) [105]. 1913 wird die Erkrankung von Berg erstmals als dominante Erbkrankheit erkannt [5].

Mit dem technischen und wissenschaftlichen Fortschritt ab Mitte des 20. Jahrhunderts wurden weitere, wichtige Erkenntnisse - besonders zu den molekulargenetischen Grundlagen und den zahlreichen möglichen Organmanifestationen - gewonnen. Ein Meilenstein im molekularen Verständnis der Erkrankung gelang durch die Identifikation der Gene *TSC1* und *TSC2* [30, 43, 70], deren Mutationen letztendlich Ursache der Erkrankung sind, sowie durch die Identifikation ihrer Genprodukte Tuberin (*TSC2*) und Hamartin (*TSC1*) in den Jahren 1993 bis 1997 [1, 102].

Ein jüngerer Erfolg in der Erforschung des TSC ist sicherlich das Verständnis der wichtigen Rolle einiger Protein-Signalkaskaden des Zellzyklus, die durch die jeweilige Mutation beeinflusst werden. Ein zentrales Element ist die mTOR-Signalkaskade (mammalian target of rapamycin)[31, 39, 99]. Deren pharmakologische Beeinflussung durch mTOR- Inhibitoren den Weg zu einer pathogenetisch orientierten Behandlung des TSC gebahnt hat [6, 28, 45].

## 1.1 GRUNDLAGEN

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGIE UND GENETIK

Die Angaben zu Inzidenz und Prävalenz basieren hauptsächlich auf Veröffentlichungen aus dem europäischen und US-amerikanischen Raum, können jedoch als weltweit geltend angenommen werden. Laut neuesten Angaben der "International Tuberos Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 beläuft sich die Häufigkeit unter Lebendgeburten auf 1/6000 bis 1/10000, die Prävalenz innerhalb der Bevölkerung wird mit bis zu 1 von 20000 angegeben, auch in der übrigen Literatur lassen sich ähnliche Werte finden [18, 72, 76].

Der TSC folgt einem autosomal dominanten Erbgang, damit ergibt sich für Kinder und Geschwister von Betroffenen ein Wiederholungsrisiko von 50%.

Allerdings wird angenommen, dass bis zu 75 % der Fälle sporadischer Natur, also durch neu aufgetretene Mutationen entstanden, sind. Insgesamt zeigt sich die Geschlechterverteilung ausgewogen[67].

Die Penetranz der Erkrankung wird als vollständig angesehen, jedoch zeigt sich eine deutlich vorhandene Variabilität des Schweregrades.

## 1.1.2 KRANKHEITSBILD UND -VERLAUF

Das klinische Bild des TSC ist mannigfaltig und es können Symptome in jedem Organ auftreten. Einige der Manifestationen sind dabei pathognomonisch für die Erkrankung, andere wiederum finden sich auch bei anderen Erkrankungen oder in geringem Maße in der gesunden Bevölkerung. Wichtig ist zu erwähnen, dass einige der Symptome aufgrund ihrer Spezifität für TSC als Diagnosewerkzeug dienen. Erstmals wurden die, in Haupt- und Nebenkriterien aufgeteilten, Diagnosekriterien 1998 auf der "International Tuberos Sclerosis Complex Consensus Conference" (ITSCCC) in Annapolis, USA postuliert [83]. Während der zweiten ITSCCC 2012 wurden diese dann geprüft und zum Teil revidiert [72] (siehe Kapitel 1.1.4.1).

### 1.1.2.1 MANIFESTATIONEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM

Zu den wichtigsten Manifestationen des TSC im ZNS (Zentralnervensystem) gehören die kortikalen Tubera, die subependymalen Gliaknoten (SENs, subependymal nodules) und die subependymalen Riesenzellastrozytome (SEGAs, subependymal giant cell astrocytomas).

Kortikale Tubera, bei 80 bis 85 % [15] der Erkrankten vorkommend, sind in Anzahl und Lokalisation stark variabel und treten multipel in der Hirnrinde und der subkortikalen weißen Substanz auf. Sie zeichnen sich durch eine Proliferation von dysplastischen und hypomyelinisierten Gliazellen und Neuronen aus, die hexalaminare Struktur des Cortex ist aufgehoben [54] S.13.

Ähnlich wie die fokale kortikale Dysplasie und Hemimegalencephalie werden sie der Gruppe der fokalen kortikalen Malformationen zugerechnet [75].

Bereits in frühen Schwangerschaftswochen können sie mittels hochauflösender Magnetresonanztomographie dargestellt werden [56]. Symptomatisch werden die kortikalen Tubera vorwiegend durch schwer beherrschbare Epilepsieformen und Lernschwierigkeiten [72].

Subependymale Knoten hingegen sind Hamartome und häufig asymptomatisch. Sie entstehen während der Fetalperiode, meist ausgehend von der subependymalen Wand der Seitenventrikel, manchmal fallen sie in das Ventrikellumen vor [18]. Meist befinden sich solche SENs in Nachbarschaft zum Foramen Monroe und sind größer als 5 mm [18].

Bei ungefähr 10 % der Betroffenen entwickeln sich aus subependymalen Knoten, die im Gegensatz zu Tubera weiter wachsen können, subependymale Riesenzellastrozytome [54] S. 14.

Diese entwickeln sich mit einer Häufigkeit von 6-14 % aller TSC-Fälle, vorwiegend in der späten Kindheit und im Jugendalter [67]. Histologisch bestehen sie aus wuchernden Astrozyten und Riesenzellen, wobei keine malignen Gliatumore aus ihnen hervorgehen [32].

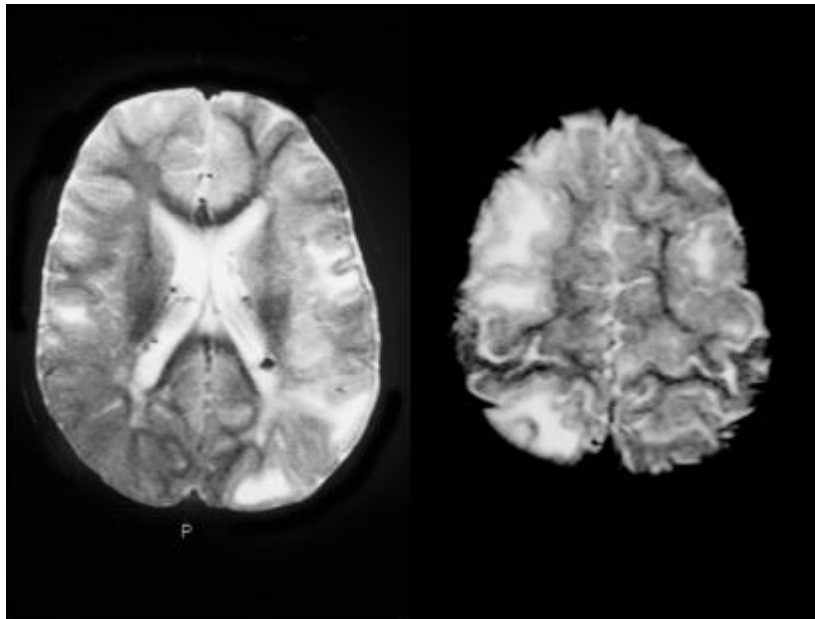
Dennoch können die SEGAs zum Tode oder schweren Komplikationen wie Erblindung führen, wenn sie durch ihre Lage den Liquorabfluss behindern und so zu steigendem intrakraniellen Druck führen [32].



Außerdem zu erwähnen sind radiäre Heterotypien der weißen Hirnsubstanz. Es handelt sich um Neuroneninseln, also graue Substanz, die in der weißen Substanz versprengt sind und somit atypisch liegen [81, 89].

In ca. 85 % der Fälle geht eine Tuberöse Sklerose mit unterschiedlichen Formen von Epilepsie einher [12]. Ferner zeigen fast 50% der Erkrankten eine Einschränkung der geistigen Leistungsfähigkeit [40, 110].

Auch verschiedene Formen von Autismus können mit dem TSC vergesellschaftet sein [17].



**Abbildung 1: MRT des Gehirns mit Tubera und SEN (aus [89])**

#### 1.1.2.2 HAUTMANIFESTATIONEN

Ebenso wie das ZNS sind auch die Haut und Hautanhangsgebilde sehr häufig betroffene Organe bei Patienten mit TSC [54]. S. 15. Verschiedene Hautmanifestationen treten mit einer Häufigkeit von 90 % auf und kommen meist in Kombination vor.

Zu den Erscheinungsbildern zählen hypomelanotische Makulae, faziale Angiofibrome sowie fibröse Stirnplaques, Pflastersteinnävi (Chagrin-Haut) und Konfetti-Flecken. Ebenso zu erwähnen sind periunguale Fibrome (Koenen-Tumore) [84].

Hypomelanotische Flecken treten bei über 90% (97,2%) der Erkrankten auf, sie zeigen meist eine blattförmige bis polygonale Form und können in ihrer Größe von einigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern variieren. Hauptsächlich zu finden sind sie am Stamm und dem Gesäß. Da sie häufig bereits bei der Geburt vorhanden sind, bzw. schon in den ersten Lebenswochen auftreten, sind sie eines der am frühesten verfügbaren Diagnosekriterien. Zu beachten ist jedoch, dass sie bei Tageslicht gegebenenfalls nur schwer zu sehen sind, sie können aber mit langwelligem, ultraviolettem Licht mit dem speziellen Filter ( $\lambda$  365 nm) der Wood-Lampe gut sichtbar gemacht werden.

Da sie vereinzelt auch in der gesunden Bevölkerung vorkommen, müssen mindestens drei hypomelanotische Flecken vorhanden sein, um als eines der von Roach et al. 1998 [83] definierten Diagnosekriterien zu gelten [27, 95]. Auch in den revidierten Diagnosekriterien von 2012 werden die hypomelanotischen Flecken aufgeführt [72].

Auch Konfetti-Flecken sind hypomelanotische Areale, jedoch sind sie bedeutend kleiner als die hypomelanotischen Makulae (nur ein bis drei Millimeter). Sie treten symmetrisch über die gesamten Extremitäten verteilt auf und lassen sich häufiger im Erwachsenenalter finden [95].

Auch sie sind, seit 1998 durch Roach et al. ein eigenes Diagnosekriterium, zählen jedoch zu den Nebenkriterien [83]. Daran wurde auch bei der Überarbeitung der Diagnosekriterien auf der "International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 festgehalten [72].

Faziale Angiofibrome sind rötliche Papulae, die bei etwa 70 bis 80% auftreten. Sie erstrecken sich schmetterlingsförmig über Nase, Nasolabialfalte und Wangen unter Aussparung der Oberlippenregion. Meist entstehen sie im Alter von zwei bis fünf Jahren und nehmen während des weiteren Lebens zu. Feingeweblich bestehen sie aus Gefäßen und Bindegewebszellen [18, 95].

Histologisch ähnlich aufgebaut sind fibröse Stirnplaques. Hierbei handelt es sich um gelblich-bräunliche, erhabene Läsionen der Stirn- und Kopfhaut. Sie kommen im Gegensatz zu Angiofibromen nur bei etwa 20 bis 30% vor, können jedoch auch bei Geburt schon vorhanden sein [18, 95].

Gemäß den Empfehlungen von Roach et al. [84], werden fibröse Stirnplaques und faziale Angiofibrome als ein Diagnosekriterium zusammengezählt.

Bei Pflastersteinnävi oder auch Chagrin-Haut handelt es sich um Bindegewebsnävi, die bei etwa 50% der Erkrankten auftreten [109]. Man findet sie gelblich bis rötlich mit lederartiger Oberfläche, meist am lumbosakralen Übergang. Selten bereits bei Kindern zu sehen, nehmen sie jedoch im Alter an Anzahl und auch Größe zu [18, 95].

Periunguale Fibrome sind bindegewebige Hamartome, die sich entlang des Nagelfalzes befinden, wobei die Füße stärker als die Hände betroffen sind, häufiger zu finden sind sie beim weiblichen Geschlecht [107]. Sie entwickeln sich meist erst in der zweiten Lebensdekade [109]. Ihr Auftreten kann - auch bei gesunden Menschen - durch Traumata begünstigt werden [95].

Bei TSC-Patienten gibt es noch einige weitere Hautauffälligkeiten, diese sind jedoch eher unspezifisch. Da sie auch in der gesunden Bevölkerung vorkommen, können sie nicht zur klinischen Diagnose des TSC herangezogen werden [82]. Zu nennen sind Cafe-au-lait-Flecken sowie Pendelfibrome [95].



Abbildung 2: Faziale Angiofibrome (aus [89])



Abbildung 3: Chagrin-Haut (Pflastersteinnaevus, Shagreen-Patch) (aus [89])

### 1.1.2.3 NIERENBETEILIGUNG

Eine Beteiligung der Nieren tritt mit großer Häufigkeit bei Patienten mit TSC auf, wobei die Häufigkeit des Auftretens zwischen 60 bis 75% beschrieben wird [14, 73]. Dabei variiert die klinische Bandbreite von Beschwerdefreiheit bis hin zur manifesten Niereninsuffizienz.

Bei der häufigsten renalen Läsion handelt es sich um Angiomyolipome, oft AML abgekürzt. Diese sind gutartige Tumore aus Fettgewebe, glatten Muskelzellen und anormalen Gefäßen, die häufiger bei Frauen als Männern zu finden sind [80]. Typisch sind ein beidseitiges Auftreten oder multiple Angiomyolipome in einer Niere [85].

Aufgrund des hohen Anteils an Gefäßen kann es, vorwiegend bei großen AML (> 3-4 cm), zu Blutungen kommen, die lebensbedrohlich sein können [15, 18].

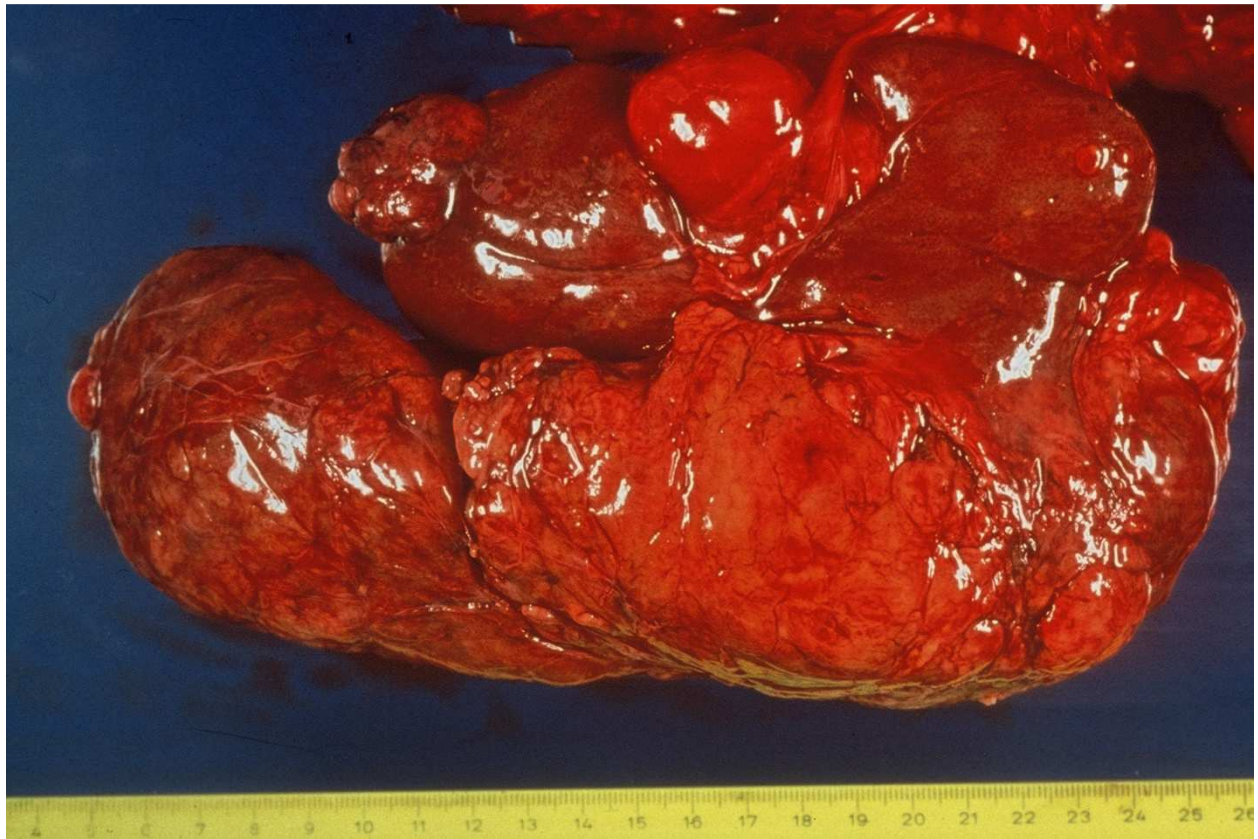
Da Angiomyolipome auch in anderen Organen, wie z.B. der Leber beobachtet wurden, einigte man sich auf der aktuellen "International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 darauf, den Zusatz "renale" beim Hauptkriterium AML weg zu lassen [72].

Renale Zysten sind auch eine häufig beobachtete Läsion der Niere bei TSC-Patienten. Sie können einzeln, multipel und auch bilateral auftreten. Meist zeigen sie sich asymptomatisch.

Typisch für TSC ist das gleichzeitige Vorliegen von Nierenzysten und renalen Angiomyolipomen [85].

Einen Sonderfall stellt ein in ca. zwei bis drei Prozent auftretendes "Contiguous Gene Syndrome" dar. Hierbei handelt es sich um große Deletionen im TSC2-Gen, die auch das unmittelbar angrenzende PKD1-Gen betreffen, wodurch es zusätzlich zum TSC zu einer polyzystischen Nierendegeneration (Polycystic kidney disease 1) kommt. Diese führt bereits in der Adoleszenz zu einer schweren, terminalen Niereninsuffizienz [15].

Die Lebenszeitprävalenz von Nierenzellkarzinomen (NCC) wird für TSC-Patienten und die allgemeine Bevölkerung mit ca. zwei bis drei Prozent als ungefähr gleich angenommen. Wichtig ist jedoch, dass Nierenzellkarzinome bei TSC-Erkrankten meist sehr viel früher in Erscheinung treten [15]. Laut einer Studie von Washecka et al. liegt das Durchschnittsalter des Auftretens eines NCC bei TSC-Patienten bei 28 Jahren. Somit tritt ein NCC bei TSC ca. 25 Jahre früher auf als in der Allgemeinbevölkerung [108].



**Abbildung 4: Pathologisch-anatomisches Präparat einer Niere mit großen Hamartommassen (aus [89])**

#### 1.1.2.4 AUGENBETEILIGUNG

Bei Veränderungen des Auges handelt es sich vorwiegend um Hamartome der Retina, die bei 40 bis 50 % der Erkrankten zu finden sind [95].

In der Literatur werden drei unterschiedliche Typen von Retina-Hamartomen beschrieben. Der häufigste Typ ist flach und weich, lichtdurchlässig, lachsfarben, rund bis oval und liegt auf der Oberfläche der Retina. Der zweithäufigste Typ hingegen ist etwas erhaben, weiß, kalzifiziert und multinodulär, wodurch er an eine Maulbeere erinnert, was ihm auch seinen Namen einbrachte. Der dritthäufigste Typ ist eine Mischform der beiden genannten Läsionen. In der Mitte ist er erhaben, knotig und kalzifiziert, wohingegen der Randbereich lachsfarben, semitransparent und weich ist [87].

Histologisch ähneln sie den kortikalen Tubera [72]. Solange die Läsionen nicht den Nervus opticus oder die Makula betreffen, bleiben sie asymptomatisch [87].

Beschrieben werden auch achromatische Flecken der Retina, ähnlich den hypomelanotischen Flecken der Haut [18]. Sie kommen bei 39% der Patienten vor und zählen, im Gegensatz zu den retinalen Hamartomen, zu den Nebenkriterien in der Diagnostik [72].

#### 1.1.2.5 KARDIOVASKULÄRES SYSTEM

Kardiale Rhabdomyome sind gutartige Tumoren des Herzmuskelgewebes, die sich bei fast 50 bis 70 % der Säuglinge mit TSC finden. Zu einer klinischen Beeinträchtigung führen sie jedoch nur in seltenen Fällen [15]. Meist befinden sie sich innerhalb der Ventrikel, dort können sie zu einer Obstruktion des Ausflusstraktes mit Herzinsuffizienz führen oder Ursache für kardioembolische Ereignisse werden. Eher werden sie jedoch mit Herzrhythmusstörungen in Verbindung gebracht, meist handelt es sich um

supraventrikuläre Tachykardien, z.B. im Rahmen von Präexzitationssyndromen, wie dem Wolff-Parkinson-White-Syndrom [18].

Die kardialen Rhabdomyome können bereits pränatal, ab der 20. bis 22. Schwangerschaftswoche im Ultraschall dargestellt werden [85]. Da bei multiplen pränatalen Rhabdomyomen in 75 bis 80% in der Folge die Diagnose TSC gestellt wird, stellen sie oft die Erstmanifestation dar [72]. Insgesamt zeigen die Rhabdomyome nach der Geburt jedoch meistens eine Regression, oft bis hin zum völligen Verschwinden [72].

Auch die Gefäße können bei TSC, wenn auch eher selten, betroffen sein. Vor allem Aneurysmata von Aorta und zerebralen Gefäßen sind zu nennen. Histologisch zeichnen sie sich durch einen anormalen Wandaufbau aus [55].

#### 1.1.2.6 LUNGENBETEILIGUNG

Eine symptomatische Beteiligung der Lunge entwickeln ca. ein Prozent der TSC-Patienten, wobei die klassische Manifestation die pulmonale Lymphangiomyomatose (LAM) ist. Fast ausschließlich sind Frauen betroffen. An Symptomen sind progredienter Husten und Dyspnoe sowie im späteren Verlauf Hämoptysen und Spontan-Pneumothoraces zu nennen. Symptomatisch wird die Erkrankung jedoch meist erst zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr [85], sie ist bei Patienten mit Tuberöser Sklerose dann jedoch die dritthäufigste Todesursache laut einer Studie von Sheperd et al. [96].

Die LAM zeichnet sich durch die Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur aus, die letztlich zum zystischen Umbau des Lungenparenchyms [95] und somit zur interstitiellen Lungenerkrankung führt.

Das Überwiegen des weiblichen Geschlechtes sowie eine Exazerbation der Erkrankung während Schwangerschaft oder unter hormoneller Schwangerschaftsverhütung lässt einen Zusammenhang mit Östrogen vermuten, welcher auch in therapeutische Überlegungen mit einbezogen wird [95].

Zu unterscheiden ist die mit Tuberöser Sklerose assoziierte LAM von einer sporadischen Form (S-LAM), die bei Patienten ohne TSC auftritt [42]. Bei diesen Fällen wird vermutet, dass die Erkrankung durch zwei somatische Mutationen auf dem TSC2-Gen hervorgerufen wird, anstatt, wie bei TSC, durch eine Keimbahnmutation und eine zweite somatische Mutation [36] (siehe Kapitel 1.1.3.3).

Bezüglich der TSC-Diagnostik ist zu beachten, dass ca. ein Drittel der S-LAM-Patienten auch an renalen Angiomyolipomen leiden. Somit sollten bei gleichzeitigem Vorliegen beider Ausprägungen (LAM und AML) diese nur wie ein einziges Hauptkriterium gezählt werden [72, 83, 85]. Ansonsten gilt die LAM aber als ein eigenes Hauptkriterium.

Diagnostiziert wird die LAM bei klinischem Verdacht CT-morphologisch und gegebenenfalls durch eine Lungenbiopsie.

Des Weiteren konnten bei Patienten mit TSC die multifokale, mikronoduläre Pneumozytenhyperplasie und der benigne hellzellige Lungentumor gefunden werden. Beide Manifestationen haben jedoch keine relevante Spezifität für TSC [72].

#### 1.1.2.7 ZÄHNE UND ZAHNFLEISCH

Zahnschmelzdefekte, auch als "dental enamel pits" bezeichnet, gehören zu den diagnostischen Nebenkriterien. Sie kommen bei Patienten mit TSC, im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung sehr häufig vor, wobei die Prävalenzangaben in der Literatur von 48 bis 100% reichen [95].

Auch Zahnfleischfibrome gehören zu den diagnostischen Nebenkriterien, sie treten bei 20 bis 50% der TSC-Patienten auf. Da Fibrome auch an Wangenschleimhaut und sogar Zunge beobachtet wurden,

gelten seit der "International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 intraorale Fibrome allgemein als Diagnosekriterium [72].

#### 1.1.2.8 WEITERE MANIFESTATIONEN

Weitere Organsysteme, die durch den TSC beeinträchtigt werden, sind Knochen, der Gastrointestinaltrakt, sowie endokrine Organe. Unklar ist, warum diese Organe weniger anfällig für die Ausbildung von Hamartomen sind als ZNS, Niere und Haut. Zudem erscheint es, als würden Patienten mit TSC in gehäufte Form neuroendokrine Tumoren zeigen [54] S. 369, auch wenn diese keine Hamartome sind.

Etwa 50% der Patienten zeigen Polypen des Kolon und Rektum, wobei wichtig ist, dass diese histologisch Hamartomen und nicht Adenomen entsprechen und kaum Symptome wie perianalen Blutabgang verursachen und auch kaum eine Entartungstendenz vorweisen [16, 54, 89]. Auch zum Gastrointestinaltrakt zu zählen sind Angiomyolipome der Leber, die bei 10 bis 25% der Betroffenen zu finden sind [66]. Meist handelt es sich hierbei um Zufallsbefunde in der Bildgebung durch Abdomensonographie und Computertomographie. Meist kommen sie gemeinsam mit AML der Niere vor, können aber auch isoliert auftreten, ebenso sind sie auch in der gesunden Bevölkerung zu finden. Sie scheinen bevorzugt beim weiblichen Geschlecht aufzutreten. Ernsthafte Komplikationen oder Beschwerden verursachen die AML der Leber jedoch - im Gegensatz zu denen der Niere - kaum [54] S. 380.

Die häufigsten sonstigen Auffälligkeiten des Pankreas in Zusammenhang mit TSC sind wohl hormonaktive Tumore, allen voran Insulinome [54] S. 372. Infolge der übermäßigen Produktion von Insulin werden die Patienten durch hypoglykämische Entgleisungen auffällig, die zudem andere Symptome des TSC wie Krampfanfälle beeinflussen [22]. Auch AML des Pankreas werden beschrieben. Bezüglich des Skelettes zeigen sich Veränderungen in Form von Zysten, Geschwulsten und auch Sklerosen. Diese Auffälligkeiten sind jedoch wenig spezifisch für TSC und führen meist nicht zu Beschwerden [89]. Daher wurden auch die Knochenzysten nur vorübergehend als Nebenkriterien gezählt [72].

In zahlreichen anderen Organen, vorwiegend des endokrinen Systems, können sich Hamartome finden.

#### 1.1.3 MOLEKULARE GRUNDLAGEN

Wie bereits erwähnt, ist TSC eine Erbkrankheit, die einem autosomal dominanten Erbgang folgt, wobei jedoch mehr als zwei Drittel der Krankheitsfälle sporadisch auftreten.

##### 1.1.3.1 DIE GENE TSC1 UND TSC2

Die krankheitsverursachenden genetischen Defekte finden sich auf den beiden Genen *TSC1* und *TSC2*. Identifiziert werden konnten diese durch Kopplungsanalysen in den 1980 und 90er Jahren. So konnte Fryer et al. 1987 einen Zusammenhang zwischen TSC und der Bande 34 des langen Armes von Chromosom neun, 9q34, nachweisen [30]. Durch weitere Untersuchungen gelang es Kandt et al. 1992 Chromosom 16 (16p13.3) als zweiten Genlokus für TSC zu beschreiben [43]. Die 1993 und 1997 identifizierten Gene wurden *TSC2* und *TSC1* genannt. Es handelt sich um sogenannte Tumor-Suppressor-Gene, die Zellzyklus und -wachstum regulieren.

Das *TSC1*-Gen beinhaltet 23 Exons auf einer Größe von etwa 55 kb DNA, wobei sein Transkript 8,6 kb umfasst [102]. Das *TSC2*-Gen kodiert für ein 5,5 kb großes Transkript, enthält 41 kodierende Exons und umfasst 40 kb DNA [13]. Eine Übersicht zeigt Tabelle 1.

Die beiden Gene kodieren für die Proteine Hamartin und Tuberin, die regulierend auf den Zellzyklus wirken, wie im folgenden Kapitel erläutert wird.

Tabelle 1 Charakteristika von *TSC1* und *TSC2*, modifiziert aus [18]

	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>
<b>Chromosomale Lokalisation</b>	9q34	16p13.3
<b>Größe</b>	55 kb	40 kb
<b>Anzahl an Exons</b>	23 (21 kodierend)	42 (41 kodierend)
<b>Größe des Transkriptionsproduktes</b>	8,6 kb	5,5 kb
<b>Mutationshäufigkeit</b>	10-15% bei sporadischen Fällen	75-80% bei sporadischen Fällen
<b>Protein</b>	Hamartin	Tuberin
<b>Proteingröße</b>	1164 Aminosäuren, 130 kDa	1807 Aminosäuren, 180 kDa
<b>Proteinfunktion</b>	Im Komplex mit Tuberin Regulation von: mTOR-S6-K* und Zelladhäsion	Im Komplex mit Hamartin Regulation von : mTOR-S6-K und GTPase aktivierender Proteine sowie Zellzyklus

\*S6-K: Kinase, die die Ribosomenuntereinheit S6 aktiviert

### 1.1.3.2 FUNKTION DER PROTEINE TUBERIN UND HAMARTIN

Das Produkt des *TSC1*-Genes ist das Protein Hamartin, das des *TSC2*-Genes ist Tuberin. Hamartin umfasst 1164 Aminosäuren bei einer Größe von ca.130 kDa, die Interaktion mit Tuberin findet in der Region der Aminosäuren 302 bis 430 statt. Tuberin ist ca. 180 kDa schwer und enthält 1807 Aminosäuren, es interagiert mit Hamartin an den Aminosäuren eins bis 418. Hamartin stabilisiert dabei Tuberin, indem es dessen Ubiquitin-assoziierten Abbau verhindert [67, 75]. Gemeinsam bilden sie ein funktionelles Heterodimer, welches regulierend auf Zellzyklus, Zellwachstum, Zellgröße und Zellproliferation wirkt [15, 75]. Hauptsächlich erfolgt dies durch die Inhibierung des mammalian target of Rapamycin Signalweges (mTOR-Kaskade). mTOR reguliert in Abhängigkeit vieler Faktoren, wie Sauerstoff-oder Nährstoffangebot oder Vorhandensein von Wachstumsfaktoren, Zellzyklus und Zellwachstum [18]. Zwei Zielproteine von mTOR sind die S-6-Kinase und das "eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1" (4E-BP1) [67]. S6K ist eine Kinase, die die Ribosomenuntereinheit S6 aktiviert und so zu vermehrter Translation von Proteinen führt. 4E-BP1 supprimiert die Aktivität des "eukaryotic translation initiation factor 4E". Diese hemmende Funktion wird durch die mTOR-induzierte Phosphorylierung aufgehoben, auch dadurch kommt es somit zu gesteigerter translationaler Aktivität [67].

Der Hamartin-Tuberin-Komplex führt zur Inaktivierung von mTOR über das G-Protein Rheb (Ras homologue enriched in brain). G-Proteine können Guanosinnukleotide binden. Ist Guanosindiphosphat (GDP) gebunden liegt das Protein in seiner inaktiven Form vor. Im Gegensatz hierzu ist es mit Guanosintriphosphat (GTP) aktiv. Rheb führt in seiner aktiven Form zur Stimulation von mTOR [100]. Der Hamartin-Tuberin-Komplex besitzt eine GTPase-aktivierende Domäne und führt über diese zur Spaltung von GTP in GDP, wodurch Rheb inaktiviert wird. Die Stimulation von mTOR entfällt. Es kommt zum Arrest von Zellwachstum [95].

Die Aktivität des Tumorsuppressorproteines Hamartin-Tuberin selbst wird über zahlreiche Wege reguliert. Inaktiviert wird der Komplex durch die Phosphorylierung mittels Proteinkinase B (PKB). Viele Wachstumsfaktoren wie Insulin und IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) aktivieren die Aktivität der PKB. Der Hamartin-Tuberin-Komplex wird durch Faktoren wie Energiemangel oder Hypoxie über die Aktivierung der AMP-abhängigen Proteinkinase AMPK aktiviert [58] S. 625.

Entfällt die Inhibierung der mTOR-Signalkaskade durch den TSC-Komplex, kommt es somit zu Zellwachstum. Einen Überblick über die so vermittelten Zellregulationsmechanismen zeigt die folgende Abbildung.

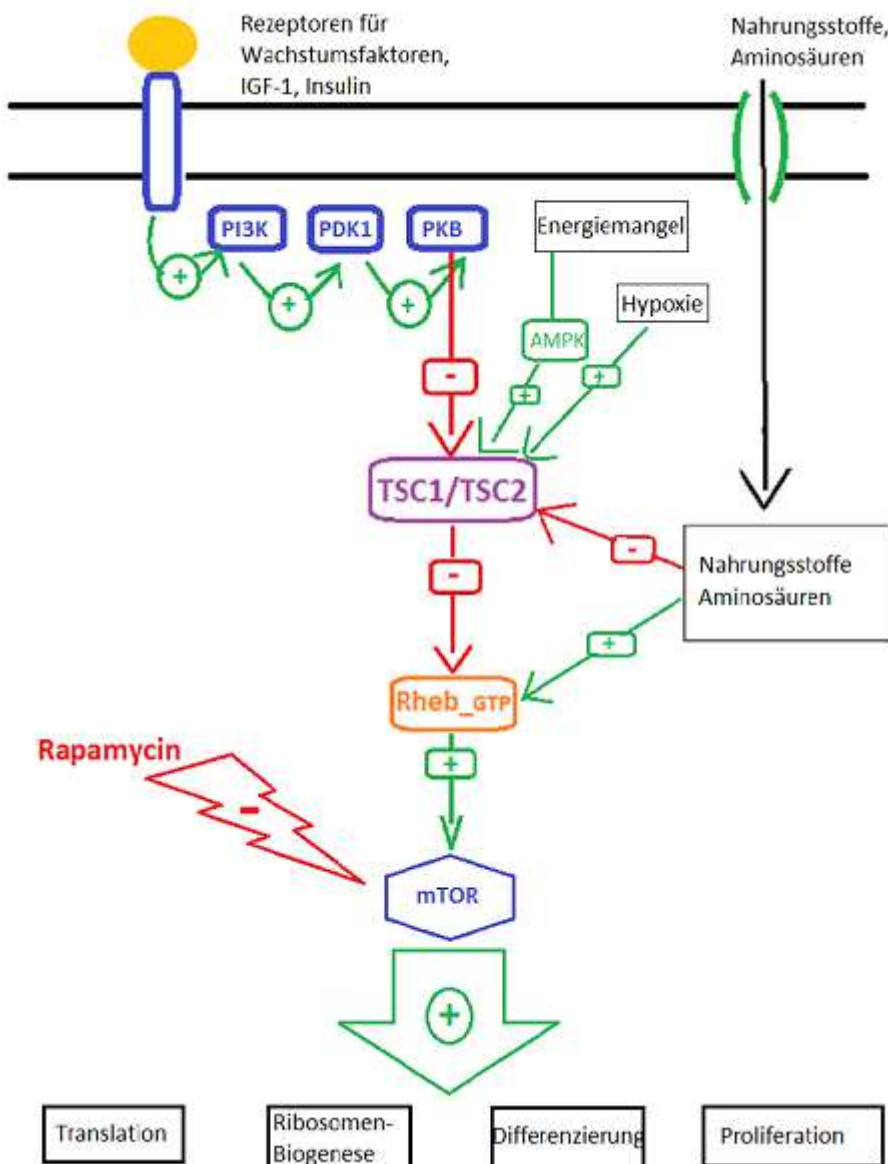


Abbildung 5: mTOR-Signalkaskade

PI3K = Phosphatidylinositid-3-Kinase; PDK1 = Phospholipid-dependent Kinase-1; PKB = Proteinkinase B; AMPK = AMP-abhängige Proteinkinase



### 1.1.3.3 ZWEI-TREFFER-THEORIE UND MOSAIKE

Gemäß der Zweitreffertheorie von Knudson geht man auch bei TSC davon aus, dass es einen Verlust beider Allele eines Genes bedarf, um den zellulären Phänotyp zu verändern [47]. Dies heißt, dass sich die Erkrankung auf Zell-Niveau rezessiv verhält. Es bedarf zweier unabhängiger Mutationen beider Allele des *TSC1* oder des *TSC2* Genes. Der erste Treffer wird von einem Elternteil vererbt oder ist in der elterlichen Keimzelle als sporadische Mutation neu entstanden. Diese heterozygote Mutation weisen dann alle Körperzellen des Kindes auf. Der zweite Treffer wird nicht vererbt, er entsteht als somatische Mutation des zweiten elterlichen, homologen Genes. Die betroffene Zelle zeigt in der Folge eine gestörte Funktion mit vermehrter Zellteilung und verminderter Ausdifferenzierung. Es kommt also zu einer lokal begrenzten geweblichen Fehlentwicklung. Dieser Vorgang erklärt somit, warum TSC an vielen Stellen lokal begrenzte Veränderungen aufweist und warum lebenslang neue Tumore entstehen können [89]. Dominant erfolgt die Weitergabe der ersten, in der Keimbahn befindlichen, Mutation. Hier handelt es sich um eine Heterozygotie für die Mutation. Durch den zweiten Treffer kommt es häufig zum Verlust des zunächst noch vorhandenen "Wildtyp-Allels", in der Literatur als "Loss of Heterozygosity=LOH" bezeichnet.

Dieser LOH kann vielfach bei TSC nachgewiesen werden; er findet sich in Zellen aus Angiomyolipomen, kardialen Rhabdomyomen, subependymalen Riesenzellastrozytomen und pulmonalen Lymphangiomyomatosen, kaum jedoch in Gewebeproben aus Tubera [15].

Als genetisches Mosaik bezeichnet man einen Organismus, der eine bestimmte Mutation nur in einem Teil der Zellen zeigt, nicht jedoch in allen Körperzellen. Solche Mosaik kommen zustande, wenn die Mutation erst nach der Befruchtung der Oozyte in einer Zelle des sich entwickelnden Organismus im Metazellstadium entsteht [89]. Allgemein weisen diese Patienten oft einen milderen Phänotyp auf, der nur einzelne Organsysteme betrifft, jedoch können die Nachkommen - wenn die Keimzellen auch die somatische Mutation tragen - deutlich schwerer betroffen sein, da dann wiederum alle Körperzellen betroffen sind [103]. Somatische Mosaik machen etwa zehn Prozent der Neumutationen aus [91]. Desweiteren gibt es Keimzellmosaik. Diese zeichnen sich durch eine Mutation, die sich ausschließlich in -manchen- Keimzellen (also Oozyte der Frau oder Spermium des Mannes) befindet, aus. Die Mutationsträger haben keine Symptome. Solch ein Keimzellmosaik kann bei klinisch unauffälligen Eltern eines betroffenen Kindes vorliegen und wurde bei Familien mit mehreren betroffenen Kindern gesunder Eltern entdeckt [85, 103].

### 1.1.3.4 MUTATIONSSPEKTRUM

Gemäß der 2011 erschienen Übersichtsarbeit von Kwiatkowski über TSC [54] waren zu der Zeit über 450 kleine Mutationen (nur ein Exon betreffend) auf dem *TSC1*-Gen und über 1160 auf dem *TSC2*-Gen bekannt. Hinzu kommen die großen genomischen Deletionen, wobei diese auf dem *TSC1*-Gen eher selten und auf dem *TSC2* häufiger zu finden sind. Laut Kwiatkowski sind die häufigsten Mutationen auf dem *TSC1*-Gen Deletionen und Nonsense-Mutationen, wohingegen Insertionen und Spleiß-Mutationen selten auftreten, Missense-Mutationen finden sich kaum. Missense-Mutationen auf dem *TSC2*-Gen hingegen finden sich, gemeinsam mit Deletionen und Nonsense-Mutationen, am häufigsten. Insertionen und Spleiß-Mutationen sind auch hier eher selten. Ungefähr die Hälfte der *TSC1* und *TSC2* Mutationen ist bisher jeweils ein einziges Mal aufgetreten [54].

Die Anzahl aller genomischen Deletionen auf dem *TSC2*-Gen beläuft sich auf über 130 [49, 59, 92]. Hingegen sind nur neun große Rearrangements für *TSC1* beschrieben [49, 59, 68]. Etwa zwei bis drei

Prozent aller großen TSC2-Deletionen erfassen das in 3'Richtung benachbarte PKD1-Gen, das für die autosomal dominante Zystennieren verantwortlich ist [92]. Dies hat zur Folge, dass diese TSC-Patienten die zusätzliche renale Erbkrankheit in besonders schwerer Ausprägung mit früher Manifestation aufweisen. Das gleichzeitige Vorkommen von TSC und der polyzystischen Nierenkrankheit wird als eines der "Contiguous gene syndrome" (*PKD1/TSC2-Contiguous-gene-syndrome*) bezeichnet.

In der "Leiden Operation Variation Database" (LOVD) sind derzeit 705 einmalige Sequenzvarianten in *TSC1* und 1975 einzigartige Sequenzvarianten in *TSC2* aufgelistet einschließlich benigner Polymorphismen und nicht klassifizierter Varianten (Stand 28.07.2015, 12:33 Uhr, [http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select\\_db=TSC1](http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC1) und [http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select\\_db=TSC2](http://chromium.lovd.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC2)).

Die Mutationen sind in beiden Genen über die gesamte Region verteilt. Sogenannte "hot spots" mit sehr hohen Mutationsraten werden in der Literatur nicht beschrieben [15, 18]. Allerdings zeigen sich Häufungen an bestimmten Exons. So sind etwa ein Viertel aller *TSC1*-Mutationen auf dem sehr großen Exon 15 zu finden, auch in Exon 17 und 18 treten häufig Mutationen auf [54] S. 37+39. Auf dem *TSC2*-Gen scheinen sich Missense-Mutationen in der GAP-Domäne von Exon 35 bis 39 zu häufen [60], desweiteren bevorzugt sind die Exons 16,33 und 40 [54] S. 39.

Abbildung 6 Verteilung der Mutationstypen in *TSC1*

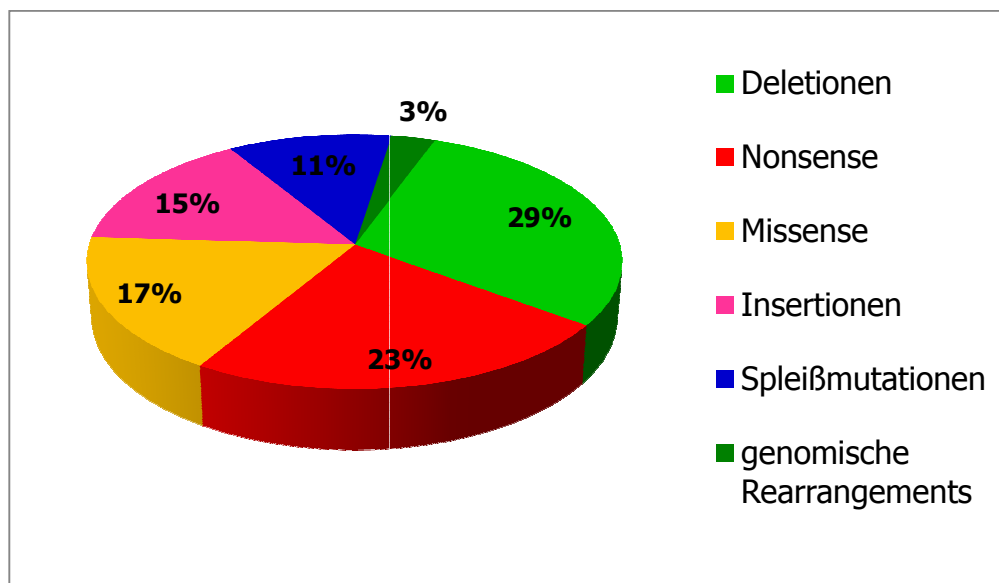
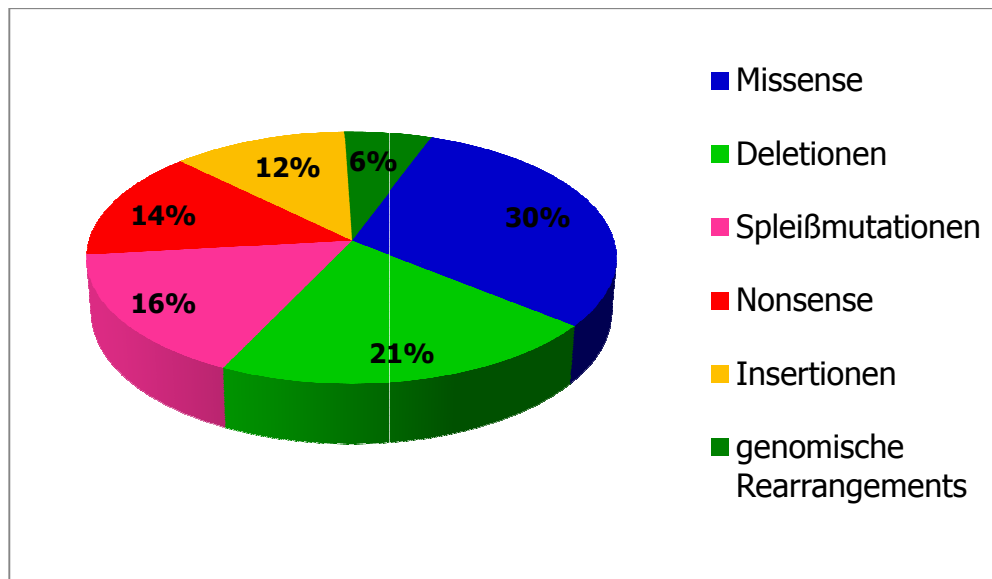


Abbildung 7 Verteilung der Mutationstypen in *TSC2*



#### 1.1.3.5 GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION - BISHERIGE ERGEBNISSE

Bei vielen genetischen Erkrankungen können Ort und Art der Mutation den krankheitstypischen Phänotyp beeinflussen. Durch solch eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation stehen Informationen zur Verfügung, die einen möglichen Verlauf der Erkrankung voraussagen lassen, und dadurch eine frühzeitige Therapieplanung ermöglichen. Für den Fall des TSC hat sich die Erstellung einer strikten, mutationsspezifischen Genotyp-Phänotyp-Korrelation seit Entdeckung beider Gene jedoch schwierig dargestellt. Hierfür verantwortlich ist vor allem die enorme Variationsbreite der klinischen Manifestationen. Trotzdem konnten in den vergangenen Jahren einige allgemeine Zusammenhänge zwischen Genotyp und Phänotyp identifiziert werden. So ist es aktuell mehrfach in großen und kleinen Studien nachgewiesen worden, dass *TSC1*-Mutationen einen milderen Krankheitsverlauf aufweisen [2, 19, 38, 93]. Bei *TSC2*-Patienten sind Epilepsie und mentale Retardierung häufiger und verlaufen schwerer, ebenso sind kortikale Tubera, renale Angiomyolipome, retinale Hamartome und ausgeprägte faziale Angiofibrome häufiger [19]. Es ließ sich zudem nachweisen, dass familiär vererbte Mutationen meist mildere klinische Manifestationen hervorrufen als de-novo-Mutationen [2, 93]. Außerdem zeigen einige Studien, dass klinisch betroffene Patienten ohne molekulargenetisch identifizierbare Mutation einen vergleichsweise milden Phänotyp haben [2, 93].

Eine weitere Korrelation scheint zwischen Geschlecht und einigen klinischen Erscheinungsbildern zu bestehen. So lässt sich die pulmonale Lymphangiomyomatose fast ausschließlich bei Frauen finden. In der 2005 publizierte Studie von Sancak et al. [93] hatten Männer signifikant häufiger eine geistige Behinderung, ausgeprägte faziale Angiofibrome und eine Augenbeteiligung. Au et al. [2] beschreiben 2007 vermehrt Tubera, SEN, mentale Retardierung und Krampfanfälle bei Männern mit TSC.

Die genannten Korrelationen beziehen sich vor allem auf die Unterscheidung *TSC1* oder *TSC2* und ob die Mutation familiär ererbt oder sporadisch neu entstanden ist. Die extreme Variationsbreite in Ausmaß und Schwere der klinischen Manifestationen, sogar bei Vorliegen der gleichen Mutation [88], zeigt, dass

eine spezifische Korrelation einzelner Mutationen mit einem bestimmten Phänotyp schwierig nachzuweisen ist, beziehungsweise nicht besteht.

#### 1.1.4 DIAGNOSTIK

##### 1.1.4.1 KLINISCHE DIAGNOSE ANHAND HAUPT-UND NEBENKRITERIEN

Lange Zeit war die 1908 von Vogt postulierte Trias aus Epilepsie, mentaler Retardierung und fazialen Angiofibromen diagnostisches Hauptinstrument zur klinischen Diagnosestellung einer Tuberösen Sklerose. Doch in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde zunehmend klar, dass diese nicht ausreicht, um die große Variabilität an Symptomen abzubilden und eine sichere Diagnose zu stellen. Aufgrund dieser hohen Variabilität und der zunehmenden Erkenntnisse über die molekulargenetischen Pathomechanismen, formulierte ein internationales Expertenkomitee während der "Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" 1998 in Annapolis, USA, fundamental überarbeitete Diagnosekriterien (siehe Tabelle 2). Diese sollten einen einheitlichen und zuverlässigen Standard für die Diagnosesicherung des TSC bieten [84]. Die Kriterien wurden 2004 von E.S. Roach nochmals überarbeitet [85]. Wichtig war die Erkenntnis, dass - wie schon bei der Vogt'schen Trias - die klinischen Symptome für sich alleine genommen meist nicht pathognomonisch für den TSC sind, da viele von ihnen, wie zum Beispiel hypomelanotische Flecken, in Einzelfällen auch bei Gesunden zu finden sind. Daraus resultiert die Forderung, dass TSC-assoziierte Läsionen in mindestens zwei oder mehr Organsystemen vorhanden sein müssen, beziehungsweise, dass in einem Organsystem mindestens zwei unterschiedliche Läsionstypen vorliegen sollten, um die Diagnose klinisch zu bestätigen [85]. Auch die beiden Elemente Epilepsie und mentale Retardierung aus der Vogt'schen Trias wurden als Indikatoren für TSC ausgeschlossen. Grund hierfür war ihre mangelnde Spezifität [85].

Die 1998 veröffentlichten Diagnosekriterien unterteilen sich in Haupt- und Nebenkriterien und betreffen die Organsysteme ZNS, Haut- und Hautanhangsgebilde, Zähne, Gastrointestinaltrakt, Herz und Lunge, Nieren, Augen und Skelett (vgl. Tabelle 2). Eine gesicherte Diagnosestellung erfolgt bei Vorliegen von zwei Hauptkriterien oder eines Haupt- und zweier Nebenkriterien. Wenn ein Hauptkriterium und ein Nebenkriterium festgestellt werden, ist die Diagnose wahrscheinlich. Sollte sich nur ein Hauptkriterium finden oder zwei bzw. mehrere Nebenkriterien alleine, so ist die Diagnose als möglich anzusehen [84].

Tabelle 2 Klinische Diagnosekriterien nach [83]

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Faziale Angiofibrome oder Stirnplaque	Mehrere, zufällig verteilte Zahnschmelzdefekte
Nicht-traumatische Nagelfalztumore	Hamartomartige Rektumpolypen ***
Drei oder mehr hypomelanotische Flecken	Knochenzysten
Chagrin-Haut (Bindegewebsnävus)	Radiale Heterotypien der weißen Hirnsubstanz *
Kortikale Tubera *	Zahnfleischfibrome
Subependymale Knoten	Hamartome außerhalb der Niere ***
Riesenzellastrozytom	Unpigmentierter Fleck der Netzhaut.
Multiple Hamartome der Netzhaut	Konfettiflecken der Haut
Kardiale Rhabdomyome (einzeln oder mehrere)	Multiple Nierenzysten
Pulmonale Lymphangioliomyomatose **	
Renale Angiomyolipome **	

\* Bei gemeinsamem Auftreten von kortikalen Tubera und Heterotopien der weißen Hirnsubstanz, sollten sie als **Ein** Kriterium gewertet werden  
\*\* Bei gleichzeitigem Vorliegen von pulmonaler Lymphangioliomyomatose und renalen Angiomyolipomen zählen diese wie **Ein** Kriterium, zur definitiven Diagnose sollten daher noch weitere Kriterien vorhanden sein  
\*\*\* Eine histologische Sicherung ist empfohlen

Sämtliche klinischen Beurteilungen in dieser Dissertation wurden anhand oben genannter Diagnosekriterien erstellt (siehe Kapitel 2.4).

2012 wurden die Kriterien während der zweiten "International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" in Washington D.C., USA, erneut überarbeitet und vor allem an die wissenschaftlichen Erkenntnisse seit 1998 angepasst. Die wichtigste Neuerung ist sicherlich die Aufnahme der molekulargenetischen Testung in die Diagnosestellung. Außerdem wurden die ehemals drei bestehenden Möglichkeiten "sichere", "wahrscheinliche" und "mögliche" TSC zu nur mehr zwei Möglichkeiten ("sicher" und "möglich") zusammengefasst. Weitere kleinere Änderungen an einigen Kriterien sollten der Vereinfachung und Klarheit dienen und können anhand Tabelle 3 nachvollzogen werden.

Die bereits bekannten klinischen Kriterien wurden bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität evaluiert. So wurde für die hypomelanotischen Flecken zusätzlich eine Größenangabe (>5 mm) zur Differenzierung von Konfettiflecken aufgenommen. Die Bezeichnung "Stirnplaque" wurde durch eine allgemeinere Bezeichnung ersetzt, da sich diese Effloreszenzen nicht ausschließlich auf der Stirn finden lassen. Für die

Nagelfalzfibrome wurde eine Mindestanzahl angegeben, zusätzlich wurde der Begriff "atraumatisch" gestrichen. Bei Zahnfleischfibromen werden nun auch orale Schleimhautfibrome mitberücksichtigt. Mangels Spezifität wurde das Nebenkriterium "Knochenzysten" gestrichen, ebenso wie die "hamartomartigen Rektumpolypen". Angiomyolipome werden nun als Hauptkriterium gewertet, auch wenn sie extrarenal lokalisiert sind. Unter den Begriff "Kortikale Dysplasie" fallen nun, aufgrund der histologischen Parallelen, die kortikalen Tubera aber auch die bisher als eigenständiges Nebenkriterium gewerteten Migrationslinien der weißen Hirnsubstanz. Die neuen, aktualisierten Diagnosekriterien enthalten nun elf Hauptkriterien und sechs Nebenkriterien (siehe Tabelle 3) [72].

**Tabelle 3 Überarbeitete Diagnosekriterien für TSC 2012 (Neuerungen in Kursiv), modifiziert aus [72]**

<b>Hauptkriterien</b>	<b>Nebenkriterien</b>
Faziale Angiofibrome oder <i>fibröser Plaque der Kopfhaut</i>	<i>Drei oder mehr Zahnschmelzdefekte</i>
<i>Zwei oder mehr Unguale Fibrome</i>	<i>Zwei oder mehr intraorale Schleimhautfibrome</i>
Drei oder mehr hypomelanotische Flecken, <i>Durchmesser mind. 5 mm</i>	Hamartome außerhalb der Niere
Chagrin-Haut	Unpigmentierter Fleck der Netzhaut.
<i>Kortikale Dysplasie</i> (Kortikale Tubera und oder radiale Heterotypien der weißen Hirnsubstanz )	Konfettiflecken der Haut
Subependymale Knoten	Multiple Nierenzysten
Riesenzellastrozytom	
Multiple Hamartome der Netzhaut	
Kardiale Rhabdomyome (einzeln oder mehrere)	
Pulmonale Lymphangioliomyomatose *	
<i>Zwei oder mehr Angiomyolipome *</i>	
<p>* Bei gleichzeitigem Vorliegen von pulmonaler Lymphangioliomyomatose und renalen Angiomyolipomen OHNE weiteres Kriterium ist die klinische Diagnose NICHT gesichert.  Gesicherte Diagnose: Zwei Hauptkriterien oder ein Hauptkriterium mit zwei oder mehr Nebenkriterien  Mögliche Diagnose: Ein Hauptkriterium oder zwei oder mehr Nebenkriterien</p>	
<p><b>Genetisches Diagnose-Kriterium</b>  Die Identifikation einer <u>pathogenen</u> TSC1- oder TSC2-Mutation in der DNA von Normalgewebe ermöglicht die <u>gesicherte</u> Diagnose des TSC unabhängig von der klinischen Diagnose.  Eine pathogene Mutation ist definiert als Mutation, die unumstritten die Funktion des TSC1- oder TSC2-Proteins inaktiviert, die die Proteinbiosynthese unterbindet oder deren schädlicher Effekt auf die Proteinfunktion durch funktionelle Testung überprüft wurde (Aminosäureaustausche).  Andere Varianten deren Pathogenität unklar ist, sind KEIN definitives Diagnosekriterium.  Ein unauffälliges genetisches Ergebnis schließt TSC NICHT aus und hat keinen Effekt auf die Anwendung der klinischen Diagnosekriterien!</p>	

Die unterschiedlichen Manifestationen des TSC entwickeln und verändern sich während der gesamten Lebensspanne einer betroffenen Person. Daher ist es von größter Wichtigkeit, dass eine ausführliche klinische Untersuchung in regelmäßigen Abständen wiederholt wird. Durch so gewonnene Kenntnisse kann sich erstens die Verdachtsdiagnose weiter festigen, des Weiteren ergeben sich wichtige Informationen bezüglich des Therapiemanagements [85].

#### 1.1.4.2 MOLEKULARGENETISCHE DIAGNOSTIK

Mittels molekulargenetischer Verfahren, die sich seit Entdeckung beider Gene verändert und weiterentwickelt haben, können *TSC1* und *TSC2* direkt auf Mutationen getestet werden. Da die genetische Diagnostik mittlerweile breit verfügbar und einfach zugänglich ist, und für *TSC1*- und *TSC2*-Mutationen verlässliche Tests bestehen, konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl pathogener Mutationen identifiziert werden ([www.lovd.nl/TSC1](http://www.lovd.nl/TSC1), [www.lovd.nl/TSC2](http://www.lovd.nl/TSC2)). Mittlerweile gelingt ein positiver Mutationsnachweis in 75 bis 90% der Fälle [72]. Zur Aufnahme in die Diagnosekriterien wurde eine "pathogene Mutation" auf der "International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 folgendermaßen definiert:

Eine Mutation, die offensichtlich die Proteinbiosynthese behindert und/oder die Funktion von Hamartin und Tuberin inaktiviert (z.B. Nonsense, Leserasterverschiebungen, große genomische Deletionen), oder eine Missense-Mutation, deren schädigender Effekt auf die Proteinfunktion mittels funktioneller Testung nachgewiesen wurde [72].

Genetische Varianten, deren Effekt unklar ist, werden nicht als genetisches Diagnosekriterium angesehen [72].

Die Mutationssuche verläuft in der Regel in mehreren Stufen nach Häufigkeit der bisher beschriebenen Mutationen. Zunächst erfolgt die Detektion möglicher Punktmutationen, Goldstandard hierfür ist die Sanger-Sequenzierung. Über diese Methode können bereits etwa 80% aller Mutationstypen erfasst werden [89]. Im nächsten Schritt wird eine Deletions-/Duplikationsanalyse durchgeführt [71]. Hierbei handelt es sich um eine Möglichkeit, Deletionen oder Duplikationen, die nicht durch die Sequenzanalyse identifiziert werden konnten, in genomischer DNA nachzuweisen; verschiedene Methoden, die hierfür genutzt werden, sind: Quantitative Polymersakettenreaktion (PCR), Long-range PCR, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), und chromosomaler Microarray (CMA) [71]. Große, genomische Deletionen, wie sie zum Beispiel beim *TSC2/PKD1* Contiguous Gene Syndrome vorkommen, können mit Hilfe der molekular-zytogenetischen Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) gefunden werden [89]. Durch Einsatz dieser Routine-Methoden kann bei 75 bis 90% der betroffenen Personen mit klinisch gesicherter Diagnose ein positiver Mutationsnachweis erfolgen [72, 93]. Regulatorische Mutationen, die in den Introns oder den Promoter-Regionen liegen, und mit Routine-Methoden nicht erfasst werden, könnten ein Grund hierfür sein [18]. Auch das Vorliegen von genetischen Mosaiken erschwert den Nachweis einer Mutation, hieran sollte man vor allem bei Patienten mit mildem Phänotyp und nicht nachweisbarer Mutation denken [52]. Für diese Fälle scheint das in den letzten Jahren etablierte "Next Generation Sequencing" (NGS) eine Lösung zu sein. Bei genetischen Mosaiken ist der Anteil der Zellen mit einer Mutation im untersuchten Gewebe unterhalb der Nachweisgrenze für die konventionelle Sanger-Sequenzierung. Mittels "Ultra-deep-sequencing", einer Form des NGS, kann die gesamte genomische Region der *TSC*-Gene mit erhöhter Sequenziertiefe untersucht werden. So können Mosaiken mit einem Mutationsanteil unter fünf Prozent identifiziert werden [63, 79].

### 1.1.5 THERAPIEMÖGLICHKEITEN

Die Behandlung der Ursachen des TSC, also eine Korrektur der pathogenen Mutation in einem der beiden Gene, ist nicht möglich. Der TSC kann also nicht geheilt, aber dennoch effizient behandelt werden. Die Behandlungsmöglichkeiten sind vielfältig. Dies entspricht der breiten klinischen Symptomatik. Jede Manifestation sollte von erfahrenen Vertretern des jeweiligen Fachgebietes, jedoch auch interdisziplinär, betreut werden. Bezüglich einer effizienten Behandlungsmöglichkeit, bzw. sinnvoller Nach- und Vorsorgeuntersuchungen bei Betroffenen hat die "International Tuberos Sclerosis Complex Consensus Conference" 2012 auch Richtlinien zu Kontrolle und Management erarbeitet. Einen Überblick liefern die beiden folgenden Tabellen.

**Tabelle 4 Kontroll- und Management-Empfehlungen für neu diagnostizierten TSC oder Verdachtsfälle, modifiziert aus [51]**

Organsystem	Empfehlung
<b>Genetik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anamnese über drei Generationen, um für andere Familienmitglieder ein Vererbungsrisiko abzuschätzen</li> <li>• Angebot der genetischen Diagnostik: zur Familienberatung oder wenn der Verdacht auf TSC besteht aber klinisch nicht gesichert werden kann</li> </ul>
<b>Gehirn</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Magnetresonanztomographie (MRT) des Gehirnes zum Nachweis/Ausschluss von Tubera, SEN und SEGA</li> <li>• Untersuchen auf eine TSC-assoziierte neuropsychiatrische Erkrankung (TAND = TSC Associated Neuropsychiatric Disorders)</li> <li>• Während der Kindheit Elternschulung auf das Erkennen infantiler Krampfanfälle, selbst wenn bisher noch keine stattgefunden haben</li> <li>• Anfertigen eines Routine-EEG als Ausgangsbefund. Bei abnormalem Befund, Anfertigen eines 24-Stunden-Video-EEG um subklinische Krampfaktivität zu erkennen</li> </ul>
<b>Niere</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MRT des Abdomen zum Nachweis/Ausschluss von renalen AML oder Nierenzysten</li> <li>• Screening auf arterielle Hypertonie, Einstellen eines optimalen Blutdruckes</li> <li>• Evaluieren der Nierenfunktion durch Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)</li> </ul>
<b>Lunge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lungenfunktionstestung und 6-Minutengehtest zur Bestimmung des Ausgangsbefundes sowie Durchführen einer hochauflösenden thorakalen Computertomographie (HRCT) bei Patienten mit Risiko, eine pulmonale LAM zu entwickeln, meist bei Frauen älter als 18 Jahre. Testung von erwachsenen Männern bei Auftreten von Symptomen</li> <li>• Beratung betroffener Frauen über das Risiko des Rauchens und der Einnahme von Östrogenhaltigen Arzneimitteln</li> </ul>
<b>Haut</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genaue dermatologische Untersuchung</li> </ul>
<b>Zähne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genaue zahnärztliche Untersuchung</li> </ul>
<b>Herz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ggf. fetale Echokardiographie, falls Rhabdomyome im pränatalen Ultraschall diagnostiziert wurden</li> <li>• EKG (Echokardiogramm) bei Kindern, v.a. wenn diese jünger als drei Jahre sind</li> <li>• EKG in jeder Altersgruppe zur Detektion möglicher Herzrhythmusstörungen</li> </ul>
<b>Augen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplette ophthalmologische Untersuchung mit Fundoskopie</li> </ul>

**Tabelle 5 Kontrolle und Management bei Patienten mit bereits gestellter Diagnose, modifiziert aus [51]**

Organsystem	Empfehlung
<b>Genetik</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Angebot der genetischen Diagnostik, falls noch nicht erfolgt, anbieten: bei Patienten in gebärfähigem Alter oder bei Kinderwunsch</li> </ul>



<b>Gehirn</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Magnetresonanztomographie (MRT) des Gehirnes bei asymptomatischen Patienten (&lt; 25 Jahre) alle ein bis drei Jahre zum Screening auf neu aufgetretene SEGAs. Patienten mit großen oder wachsenden SEGAs oder mit Ventrikel-erweiternden SEGAs ohne weitere Symptome sollten häufiger MRTs erhalten, zusätzlich sollten Angehörigenschulungen bzgl. neuer Symptome durchgeführt werden. Patienten mit SEGAs in der Kindheit sollten auch im Erwachsenenalter regelmäßig MRT-Untersuchungen erhalten.</li> <li>• Chirurgische Intervention bei akuter Symptomatik durch SEGAs, evtl. mit Anlage eines Liquor-Shunt. Operation oder mTOR-Inhibitoren bei Größenprogredienten aber ansonsten asymptomatischen SEGAs. Bei der Therapieentscheidung sollten berücksichtigt werden: Komplikationen, Nebenwirkungen, Kosten, Behandlungsdauer, mögliche Effekte auf TSC-assoziierte Komorbiditäten.</li> <li>• Mindestens jährliches Screening auf TSC-assoziierte neuropsychiatrische Erkrankungen (TAND). Umfassende Untersuchungen diesbezüglich während der jeweiligen Entwicklungsmeilensteine. Individuelles und evidenzbasiertes Management von neuropsychiatrischen Erkrankungen. Bei plötzlichen Verhaltensänderungen sollte eine klinische Untersuchung z.A. medizinischer Ursachen wie SEGAs erfolgen.</li> <li>• Routine-EEG bei Patienten mit gesicherter oder vermuteter Krampfaktivität. 24-Stunden-Video-EEG bei Unklarheiten, neuen Schlaf- und Verhaltensauffälligkeiten oder Änderungen der kognitiven oder neurologischen Funktion.</li> <li>• Vigabatrin ist first-line Therapie der infantilen Krampfanfälle. Adrenokortikotropes Hormon kann bei unzureichendem Erfolg durch Vigabatrin erfolgen. Die antikonvulsive Therapie anderer Anfallstypen sollte den Therapieempfehlungen der übrigen Epilepsieformen folgen. Epilepsiechirurgie ggf. bei therapierefraktärer Epilepsie. Empfohlen wird die Therapie an Epilepsiezentren mit TSC-Erfahrung.</li> </ul>
<b>Niere</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle ein bis drei Jahre MRT des Abdomen zur Kontrolle des Größenwachstums von renalen AML oder Nierenzysten</li> <li>• Jährliche Kontrolle der Nierenfunktion und des Blutdruckes</li> <li>• Embolisation gefolgt von Kortikosteroiden ist die first-line Therapie für AML mit akuter Blutung. Eine Nephrektomie sollte vermieden werden. Bei asymptomatischen, wachsenden AML (&gt; 3cm) ist eine Behandlung mit mTOR-Inhibitoren first-line Therapie. Selektive Embolisation oder Nieren-erhaltende, gewebesparende Resektion sind akzeptable second-line Therapien für asymptomatische AML.</li> </ul>
<b>Lunge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Screening auf Symptome der pulmonalen LAM (Belastungsdyspnoe und Ruhedyspnoe) bei jeder erneuten ärztlichen Vorstellung. Beratung über das Risiko des Rauchens und die Einnahme von östrogenhaltigen Arzneimitteln bei jeder erneuten ärztlichen Vorstellung.</li> <li>• Alle fünf bis zehn Jahre Durchführen einer hochauflösenden thorakalen Computertomographie bei asymptomatischen Patienten mit Risiko für eine pulmonale LAM, soweit im Ausgangsbefund keine Lungenzysten vorlagen. Patienten mit Lungenzysten im HRCT sollten eine jährliche Lungenfunktionstestung erhalten sowie ein HRCT alle zwei bis drei Jahre.</li> <li>• Einsatz von mTOR-Inhibitoren bei Patienten mit moderater bis schwerer Lungenerkrankung oder raschem Progress. TSC-Patienten mit LAM sind Kandidaten für eine Lungentransplantation, jedoch können die Komorbiditäten die Eignung für eine Transplantation beeinflussen.</li> </ul>
<b>Haut</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jährlich eine genaue dermatologische Untersuchung</li> <li>• Sich schnell verändernde oder symptomatische TSC-assoziierte Hautläsionen sollten in angebrachter Weise behandelt werden durch: chirurgische Exzision, Laser oder topische mTOR-Inhibitoren.</li> </ul>
<b>Zähne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mindestens alle sechs Monate eine genaue zahnärztliche Untersuchung sowie ein Panorama-Röntgenbild ab einem Alter von sieben Jahren</li> <li>• Symptomatische Zahndefekte, orale Fibrome oder Läsionen des Kieferknochens sollten chirurgisch behandelt werden</li> </ul>
<b>Herz</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bei Vorhandensein von asymptomatischen Rhabdomyomen bei Kindern alle ein bis drei Jahre bis zur kompletten Remission eine Echokardiographie</li> <li>• Alle drei bis fünf Jahre EKG in jeder Altersgruppe bei asymptomatischen Patienten zur Detektion möglicher Herzrhythmusstörungen. Bei Symptomatik engmaschigere und ausgedehntere Kontrollen</li> </ul>
<b>Augen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jährliche ophthalmologische Untersuchung bei Patienten mit initial festgestellter Augenbeteiligung</li> </ul>

#### 1.1.5.1 SYMPTOMATISCHE THERAPIE

Abhängig vom zu behandelnden Symptom stehen zahlreiche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung, die je nach Forschungsstand und Ausmaß der Manifestation mehr oder weniger erfolgreich sein können.

Faziale Angiofibrome können mittels verschiedener dermatologischer Techniken entfernt oder minimiert werden. Hierzu zählen die Dermabrasion (Abschleifen mit hochtourigen Fräsern), die Shave-Exzision (Ausschälen mittels Skalpell) oder die Behandlung der Effloreszenzen durch Laser. Auch Nagelfalzfibrome können mit ähnlichen Methoden behandelt werden [89].

Bei Auftreten von Riesenzellastrozytomen kann eine operative Entfernung erwogen werden, insbesondere wenn ein rapides Wachstum besteht. Bei durch SEGA hervorgerufene Hydrocephali ist die Anlage eines Liquor-drainierenden Shunts Mittel der Wahl [41].

Auch die Therapie der Krampfanfälle gestaltet sich äußerst vielfältig. Basis bildet stets eine an den Patienten angepasste medikamentöse Therapie durch Antiepileptika. Auch bei Epilepsien kann unter gewissen Umständen ein neurochirurgischer Eingriff sinnvoll sein. Hierfür sollte aber durch spezielles "Neuroimaging" der krampfauflösende Herd, also Tuber, identifiziert sein. Eine weitere Therapieoption des Krampfleidens stellt die ketogene Diät dar. Hierbei wird durch eine spezielle kohlenhydratarme und fettreiche Ernährung eine andauernde ketotische Stoffwechsellage herbeigeführt[89]. Diese scheint über verschiedene Mechanismen in die Erregungsentstehung und -weiterleitung im Gehirn einzugreifen[8].

Besonderes Augenmerk liegt auch auf der Behandlung der renalen Symptome. Vor allem AML können durch das Auslösen von retroperitonealen Blutungen lebensbedrohlich werden [96]. Angiomyolipome können mittels kathetergestützter Ablation oder Embolisation unter Erhalt des gesunden Nierengewebes verkleinert oder komplett verödet werden. Aber auch eine komplette Nephrektomie oder Teilnephrektomie kann notwendig sein [24].

Dieses Kapitel zeigt nur exemplarisch einen kleinen Ausschnitt der vielfältigen Behandlungsmethoden der durch TSC hervorgerufenen Symptome.

#### 1.1.5.2 EINSATZ VON mTOR-INHIBITOREN

Der wissenschaftliche Fortschritt im Verständnis der molekularbiologischen Pathomechanismen von TSC, insbesondere das Verständnis der zentralen Rolle von mTOR, ebnete den Weg für neue pharmakologische Therapieansätze mittels mTOR-Inhibitoren. Wie bereits in Kapitel 1.1.3.2 dargestellt, hemmt in einer gesunden Zelle der Hamartin-Tuberin-Komplex die Funktion von mTOR. Wenn diese Inhibierung durch die Inaktivierung des Heterodimers infolge von *TSC1*-oder *TSC2*-Mutationen wegfällt, kommt es zu einer Überaktivierung von mTOR. Nützlich erscheint es daher, die Inhibierung pharmakologisch durch den Einsatz sogenannter mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus und Everolimus (ursprünglich in der Immunsuppression eingesetzt) wieder herzustellen. In den letzten Jahren konnte in einigen Studien der positive Effekt von mTOR-Inhibitoren auf verschiedene Symptome des TSC gezeigt werden.

Für SEGAs konnte bereits ein sehr gutes Ansprechen auf Everolimus nachgewiesen werden. Die große Phase-III-Studie EXIST-1 konnte eine Volumen-Reduktion um 50%, sowie ein verringertes Auftreten neuer Herde und eine Reduktion schwerer Hydrocephali nachweisen [29]. Ähnliche Ergebnisse zeigte

auch die Studie von Krueger et al. [50]. Auch für Epilepsien scheinen die m-TOR-Inhibitoren vorteilhaft zu wirken. Studien an Tiermodellen zeigen eine Reduktion der Anfälle, allerdings belegen sie auch, dass die Krampfanfälle nach Absetzen des Medikaments in gleicher Schwere wiederkehren [90]. Dieses Phänomen wurde auch von der Forschergruppe um Moavero et al. beschrieben [65].

Ähnlich den zentralnervösen Symptomen, wurden auch Studien bezüglich AML mit Everolimus und Sirolimus durchgeführt. In der EXIST-2 Studie konnten eine 50%ige Volumenreduktion von AML, Ausbleiben neuer Läsionen sowie der Rückgang schwerer renaler Blutungen dokumentiert werden [7]. Auch bei AML wurde ein erneutes Wachstum nach Beendigung der Therapie mit Sirolimus beobachtet [6, 20]. In den drei genannten Studien wurde nebenbefundlich auch ein Effekt auf die LAM bei einigen Patienten beobachtet. mTOR-Inhibitoren scheinen zudem zu einer Stabilisierung der Lungenfunktion zu führen. In anderen Studien zu LAM und mTOR-Inhibitoren, die allerdings nicht nur TSC-assoziierte LAM einschlossen, wurde sogar eine Verbesserung der FEV1 (funktionelle Einsekundenkapazität) und der FVC (funktionelle Vitalkapazität) sowie der Lebensqualität nachgewiesen [64, 69, 98].

Für faziale Angiofibrome wurde vorwiegend der Effekt topischer mTOR-Inhibitoren untersucht. Es ließ sich ein signifikanter Erfolg dieser Therapie nachweisen [33, 44]. Nebenbefundlich konnte auch bezüglich fazialer Angiofibrome in den bereits genannten großen Studien zu SEGA und AML eine positive Wirkung der systemisch angewandten mTOR-Inhibitoren demonstriert werden [6, 7, 29]. Moavero et al. berichten ebenso über eine Verbesserung von fazialen Angiofibromen unter systemischer Therapie von SEGA und AML mittels Everolimus [65].

Wie bei jeder Therapie sind sicherlich auch hier ein genaues und an den Patienten angepasstes Abwägen von Wirkung und Nebenwirkung sowie Therapiealternativen zu diskutieren. Bisher scheinen die mTOR-Inhibitoren gut toleriert zu werden, die meisten Nebenwirkungen sind ihrer immunsuppressiven Wirkung geschuldet. Zu nennen sind exemplarisch Aphthenbildung, Fieber, Mukositis, Diarrhö, schwere pulmonale Infektionen und negative Effekte auf den Fettstoffwechsel [65]. Insgesamt scheinen sie jedoch eine vielversprechende Option in der Therapie der meisten Symptome zu sein.

## 1.2 FRAGESTELLUNG

Aus bisherigen Studien zeichnet sich eine gewisse Korrelation zwischen betroffenem Gen, Art und Lokalisation der identifizierten Mutation und dem klinischen Verlauf ab [2, 19, 93]. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist nach erfolgter molekulargenetischer Sicherung der Diagnose durchaus sinnvoll, um den Verlauf der Erkrankung besser einschätzen zu können und somit den Familien eine verbesserte Beratung zukommen zu lassen. Dies gilt auch im Hinblick auf ein gezieltes, nach Zeitpunkt und auch Dosis optimiertes Therapiemanagement, z.B. mit den derzeit in klinischen Studien getesteten mTOR-Inhibitoren, wobei in einer 2015 von der Gruppe um David Kwiatkowski veröffentlichten Studie leider kein Zusammenhang zwischen Gen beziehungsweise Art der Mutation und Ansprechen auf mTOR-Inhibitor-Therapie hergestellt werden konnte .

Aufgrund der hohen Fallzahl in der vorliegenden Arbeit und der Vielzahl unterschiedlicher Mutationstypen ist davon auszugehen, dass eine statistisch signifikante Korrelation, wie sie sich schon in früheren Studien abgezeichnet hat, herzustellen ist.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, die in einigen Studien bereits aufgezeigte Korrelation an einer großen Fallzahl zu bestätigen und noch differenzierter herauszuarbeiten. Dabei sollen Mutationen in beiden TSC-Genen miteinander bezüglich der Ausprägung des Schweregrades verglichen werden, sowohl hinsichtlich der übergeordneten Mutationstypen als auch der Untergruppen. Ferner sollen ggf. vorhandene Unterschiede bei den Geschlechtern und zwischen verschiedenen Altersgruppen

identifiziert werden. Dadurch soll eine genauere, nach Möglichkeit auf einzelne Mutationsarten und einzelne Loci anwendbare Genotyp-Phänotyp-Korrelation erkennbar werden.

Die Detailfragen lauten:

- Welchen Einfluss hat das mutierte Gen auf die klinische Ausprägung der Erkrankung?  
**TSC1 versus TSC2**
- Haben unterschiedliche Mutationsarten unterschiedliche Auswirkungen auf den Phänotyp?  
**Mutationen mit verkürztem Translationsprodukt versus Mutationen mit Aminosäureaustauschen**
- Welche Bedeutung hat das Geschlecht für das klinische Erscheinungsbild?  
**Männer versus Frauen (versus unbekanntes Geschlecht bei Ungeborenen)**
- Welcher Unterschied im Phänotyp ergibt sich zwischen sporadisch entstandenen Mutationen und familiär weitergegebenen?  
**familiär versus sporadisch**
- Welchen Einfluss hat die klinische Diagnose auf den Erfolg in der Mutationssuche?
- Welche Unterschiede im Phänotyp finden sich bei Patienten mit identifizierter Mutation und ohne nachweisbare Mutation?  
**positiver Mutationsnachweis versus nicht identifizierbare Mutation**

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND BETRACHTUNGSZEITRAUM

Das Patientenkollektiv setzt sich aus Männern, Frauen, Kindern und ungeborenen Feten aus der Pränataldiagnostik zusammen. Insgesamt handelt es sich um Patienten, die im Rahmen einer humangenetischen Routinediagnostik untersucht wurden, nicht um explizit für eine Studie ausgewählte Personen. Die Daten wurden retrospektiv ausgewertet.

1996 wurde diese Diagnostik am Humangenetischen Institut des Klinikums der Friedrich Alexander Universität Erlangen begonnen. Ab 2001 wurde die Arbeit am Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ) in Martinsried weitergeführt.

Die Probenentnahmen für die vorliegende Auswertung erfolgten zwischen 1987 und November 2012.

Insgesamt konnten so 1368 Patienten mit der Fragestellung nach TSC molekulargenetisch untersucht werden. Davon waren 633 Personen männlich und 677 weiblich. Um Material aus der Pränataldiagnostik handelte es sich bei 58 Proben. Jedoch nur die Indexpatienten gingen letztendlich in die statistische Auswertung ein. Es verblieben nun 352 männliche sowie 345 weibliche Patienten und 13 Ungeborene aus der Pränataldiagnostik, deren Geschlecht nicht definiert ist.

Im untersuchten Kollektiv befanden sich Patienten mit einem bereits klinisch gesicherten TSC, wie solche mit dem Verdacht und solche mit "möglichem TSC".

Bei den untersuchten Indexpatienten finden sich 97 Personen mit positiver Familienanamnese, aber unbekannter Anzahl der betroffenen Angehörigen. Bei 497 Patienten handelte es sich um einen sporadischen TSC. Den Rest stellen die Untersuchten dar, deren Status bezüglich sporadische versus ererbte Erkrankung nicht geklärt war. Zudem wurde eine Patientengruppe gebildet, bei der bis zuletzt kein sicherer Nachweis einer pathogenen Mutation gelang (Gruppe „NMI – No mutation identified“).

Zusammengefasst wurde das Kollektiv für die Auswertung in folgende Gruppen-Paare unterteilt:

- Familiär und sporadisch

- Gesicherte Diagnose (betroffen) und Verdacht auf Erkrankung (wahrscheinliche oder mögliche Diagnose laut der Kriterien von Roach et al.[83])
- MI und NMI (Mutation identifiziert und Mutation nicht identifiziert)
- Männlich, weiblich, Ungeborene ohne Information bezüglich des Geschlechts

Der Hauptanteil der Untersuchten kam aus Europa, die meisten davon aus Deutschland.

Bedauerlich und für die Auswertung bedeutsam ist, dass in keiner betrachteten Kategorie der Datensatz vollständig war. Vor allem die fehlende klinische Information bei 224 Probanden stellt hier ein Problem dar.

## 2.2 DATENAKQUIRIERUNG

### 2.2.1 ETHIKANTRAG UND EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Ein Ethikantrag wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München vorgelegt und durch diese bewilligt. Voraussetzung bzw. Einschlusskriterium war eine schriftliche Einverständniserklärung der Probanden sowie vorangehend eine schriftliche Patienteninformation sowohl für Erwachsene, als auch für Kinder (die Dokumente können im Anhang eingesehen werden). Es ist jedoch zu erwähnen, dass auch bereits zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Analyse ein sogenannter "informed consent" der Patienten zu Untersuchung und/oder wissenschaftlicher Auswertung vorlag.

### 2.2.2 DATEN AUS ROUTINEDIAGNOSTIK

Die klinischen Daten der Patienten wurden ab dem Jahr 2001 anhand eines standardisierten Fragebogens und teils bereits vorliegender, teils angeforderter klinischer Unterlagen (meist Arztbriefe, Diagnosemitteilungen von technischen Untersuchungen wie MRT, CT) erhoben. Im Rahmen der Auswertungen wurden ausnahmslos klinische Befunde bereits durchgeführter Routinediagnostik registriert; es wurden keine zusätzlichen Untersuchungen veranlasst. Die Untersuchungsergebnisse stammen von den jeweiligen, behandelnden Fachärzten der Patienten.

Der Fragebogen erfasst die von Roach et al. 1998 [83] definierten Haupt- und Nebenkriterien, lässt somit eine Diagnosestellung bereits vor der molekulargenetischen Analyse zu. Zudem besteht die Möglichkeit, über den "Roach-Katalog" hinausgehende klinische Auffälligkeiten, wie mentale Retardierung, Epilepsie oder Autismus zu nennen, dies jedoch nicht standardisiert (Eine Kopie des Fragebogens befindet sich im Anhang).

Die Rohdaten wurden mit Hilfe einer Datenbank (Microsoft Access) erfasst, verwaltet und archiviert. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine initiale Pseudonymisierung und letztendlich eine Anonymisierung der einzelnen Patientendaten.

### 2.2.3 VORGEHEN BEI FEHLENDEN KLINISCHEN DATEN

Bei unzureichender klinischer Information ging ein Schreiben an den Arzt, der die molekulargenetische Analyse veranlasst hatte, mit der Bitte um Weiterleitung und Information des betreffenden Patienten. Beigelegt waren der standardisierte Fragebogen, sowie die Patienteninformation und Einwilligungserklärung. Diese sollten ausgefüllt zurückgesandt werden.

## 2.3 VERWENDETE MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

Der lange Zeitraum des Projektes brachte es mit sich, dass im Rahmen der methodischen Weiterentwicklung mehrere Verfahren zum Einsatz kamen:

### Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC)

Bei der Methode DHPLC handelt es sich um eine Vorscreen-Methode, um Punktmutationen in doppelsträngiger DNA nachzuweisen. Doppelsträngige DNA wird erhitzt, wodurch es zur Denaturierung kommt, anschließend wieder abgekühlt, sodass sich Heteroduplices (Doppelstränge, die nicht mehr homolog sind) ausbilden können. Bei Unterschieden zwischen den beiden Strängen kommt es so letztendlich zur DNA-Fehlpaarung, welche im Chromatographen nachgewiesen werden kann, da jede Mutation einen spezifischen Elutions-Peak hat [37, 74]. In Bezug auf TSC zeigte sich die Methode Anfang 2000 v.a. geeignet, um Einzelbasen-Austausche zu detektieren. Sowohl für TSC1, als auch TSC2 konnten hier in Studien gute Ergebnisse mit hoher Spezifität und Sensitivität nachgewiesen werden [11, 86].

### Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

SSCP nützt die unterschiedliche Mobilität der Einzelstrang-DNA auf dem Elektrophorese-Gel, hervorgerufen durch unterschiedliche Konformationen aufgrund mutationsbedingter unterschiedlicher Sequenzen, aus. Diese unterschiedlichen Konformere entstehen, indem man doppelsträngige PCR-Produkte (Mischung aus Wildtyp- und mutierten DNA-Strängen) durch Erhitzen auf 95 Grad Celsius denaturiert und anschließend auf Eis wieder abkühlt. Die dadurch entstandenen Einzelstrang-Konformere falten sich dann so, dass die Anzahl der Basenpaarungen maximiert wird. In der anschließenden Gelelektrophorese kommt es bei verschiedenen Lauftemperaturen zu unterschiedlichen Banden. SSCP ist meistens einfach durchzuführen und kostengünstig mit einer Sensitivität um 90 % und einer Spezifität um 80% [37]. Für TSC wird eine Mutations-Detektions-Rate von 50 bis 75 % angegeben [54], S. 76.

### Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE)

TGGE ist eine Weiterentwicklung von DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Bei dieser Methode ist zusätzlich zum üblichen Spannungs-Gradienten über dem Gel auch ein Temperatur-Gradient angelegt. Durch Erhöhung der Temperatur kommt es bei der zu untersuchenden DNA zur Denaturierung. Die Temperatur, bei der der Denaturierungsprozess beginnt, hängt von der DNA-Sequenz ab (Guanin-Cytosin ist stabiler als Adenin-Thymin). Dadurch ist die TGGE zusätzlich zur größenabhängigen eine sequenzabhängige Methode [26]. Bezüglich des TSC, zeigte die TGGE vor allem einen Vorteil in der Detektion kleiner Mutationen in großen DNA-Fragmenten mit einer hohen Sensitivität für Basen-Austausche [34].

Den drei genannten Vorscreen-Methoden (DHPLC, SSCP, TGGE) ist es gemeinsam, dass sie sich die mutationsbedingte Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten im Elektrophorese-Gel zu Nutze machen. Im Folgenden wird eine weitere Screening-Methode erklärt, die die Mutation jedoch auf mRNA-Ebene nachweist (PTT).

Allen Vorscreen-Methoden ist gemeinsam, dass sie nur einen Hinweis auf eine Mutation in einem bestimmten Abschnitt eines Gens liefern. Der direkte Mutationsnachweis erfolgt immer anschließend durch DNA-Sequenzierung.

### Protein-Truncation Test (PTT)

Der PTT beruht darauf, dass ein Großteil der Mutationen im *TSC1* und *TSC2* Gen zu einem frühzeitigen Abbruch (Truncation) der Proteine Hamartin und Tuberin führen [61].

Es handelt sich um eine Methode, die die Mutationen auf Proteinebene sichtbar macht, und nicht - wie die meisten anderen Verfahren - auf DNA-Ebene. Hierfür wird RNA aus Blut isoliert, in cDNA umgeschrieben und vervielfacht, danach kann die DNA nach Kombination mit einer entsprechenden Promotorsequenz zum codierten Protein *in vitro* translatiert werden. Nachdem während der Proteinbiosynthese radioaktiv markiertes Methionin eingebaut wird, können die mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennten Proteinbanden durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden [3].

Der Vorteil dieser RNA-basierten Methode ist, dass einige Exons gleichzeitig getestet werden können. Zusätzlich weist sie Mutationen nach, die wirklich auf Proteinebene Auswirkungen haben [61].

Zur Detektion größerer Rearrangements werden die folgenden vier Methoden (Southern Blot, long range PCR, FISH, MLPA) verwendet.

### Southern Blot

Bei der Suche nach Mutationen im *TSC2*-Gen wurde Southern Blotting zur Detektion großer DNA-Veränderungen eingesetzt [104]. Hierfür wird genomische DNA mittels Restriktionsenzymen verdaut, die Fragmente werden dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch Zugabe von radioaktiv oder chemisch markierter komplementärer DNA kommt es zur Hybridisierung spezifischer Fragmente und so zu deren Sichtbarmachung [97]. Nachteilig sind jedoch der hohe Arbeitsaufwand und die Notwendigkeit von großen Mengen hochmolekularer, genomischer DNA, sodass weitere Methoden zur Detektion großer Deletionen entwickelt wurden [54].

### Long range PCR (Polymerase chain reaction)

Die PCR als solche, ist eine Methode zur schnellen Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Bei der herkömmlichen PCR ist die Länge der amplifizierten DNA aufgrund der Polymerase-Eigenschaften limitiert [106]. Durch den Einsatz anderer Polymerasen können in der long range PCR bis zu 20 kb-große DNA-Fragmente amplifiziert werden [21]. Spezielles Einsatzgebiet der long range PCR ist somit die Detektion großer Deletionen. Sie stellt einen weiteren Schritt in der Suche nach ursächlichen TSC-Mutationen dar, falls keine kleinen Mutationen gefunden wurden. Ihr großer Vorteil ist, dass im Gegensatz zum Southern Blot nur geringe Mengen an genomischer DNA benötigt werden.

### Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

FISH wird zum „in-situ“-Nachweis von DNA oder RNA, also zum direkten Nachweis in Geweben, Zellen oder Metaphasechromosomen verwendet. Dies geschieht durch Hybridisierung der zu untersuchenden Materialien mit einer künstlich hergestellten Nukleinsäuren-Sonde, die durch Fluoreszenzfarbstoff markiert ist [57].

In der Diagnostik von TSC erfolgt diese Methode vor allem zum Nachweis der großen *TSC2*/*PKD1*-Deletionen, die zum Contiguous gene syndrome führen [25].

### Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA)

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion genomischer Rearrangements wie Deletionen oder Duplikationen ganzer Exons ist die MLPA, ein semiquantitatives Verfahren, welches die Reduktion oder Vermehrung eines spezifischen DNA-Fragments im Vergleich zu DNA-Kontrollen anzeigt. Diese Methode basiert auf der Bindung zweier benachbarter DNA-Sequenzen, sogenannter Sonden ("probes"), an eine Gen-spezifische Zielsequenz. Dieser Vorgang wird Hybridisierung genannt. Anschließend erfolgt die Ligation. Das heißt, die beiden DNA-Bindungssequenzen werden durch eine Ligase miteinander verknüpft. Die Ligationsprodukte können dann mit einem universellen Primerpaar semiquantitativ amplifiziert werden, da sie alle jeweils identische Sequenzen an ihren Enden (Primerbindungssequenz) aufweisen. Die Amplifikationsprodukte werden anschließend durch Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Dosisunterschiede werden durch Verringerung oder Vergrößerung des Peaks sichtbar. Fehlt die Zielsequenz auf einem Chromosom aufgrund einer Deletion, ist die Peakhöhe des Fragments im Vergleich zur Kontrolle verringert, wohingegen sie bei einer Duplikation durch eine Zunahme des Peaks erkennbar wird [49, 94].

### Sanger-Sequenzierung

Die Kettenabbruchmethode nach Sanger stellt in der heutigen Mutationssuche den Goldstandard dar. An das zu untersuchende DNA-Fragment, welches zunächst mittels PCR amplifiziert und anschließend denaturiert wird, bindet ein Primer, an dessen 3'-Ende dann eine DNA-Polymerase die Synthese des komplementären Stranges beginnen kann. Zur Synthese werden die Basen in Form von Desoxyribonukleosidtriphosphaten benötigt. Zum Kettenabbruch kommt es indem von jeder Base 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) (in sehr geringer Menge)zugegeben werden, an denen keine freie 3'OH-Gruppe zur weiteren Kettensynthese vorhanden ist. So entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die ddNTPs sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, für jede der vier Basen wird hierbei eine andere Farbe gewählt. So kann das Ergebnis mittels Laser-Photometer automatisiert ausgelesen werden [58] S. 170,171.

### Next Generation Sequencing (NGS)

Eine Weiterentwicklung in der Sequenzierung stellt das NGS dar. Hierunter werden verschiedene Sequenziermethoden subsumiert, die im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung auf hocheffiziente Weise arbeiten. Dies bedeutet, dass viele Millionen von Sequenzreaktionen parallel ablaufen, wodurch ein hoher Durchsatz erzeugt wird. Das Verfahren wird möglich, indem Millionen von DNA-Abschnitten auf eine kleine Oberfläche gebunden werden und gleichzeitig ausgelesen werden. Somit ist eine zeitgleiche und kostengünstige Analyse mehrerer Gene möglich [35].

Für das hier untersuchte Kollektiv wurden die Methoden PTT, Sanger-Sequenzierung, MPLA und NGS zur Mutationssuche in beiden TSC-Genen verwendet. SSCP und HDA wurden nur zur Untersuchung des Exons 15 im *TSC1*-Gen eingesetzt, DHPLC beschränkte sich auf die Mutationssuche in den codierenden Exons des *TSC2*-Gen. Southern Blot, Long range PCR und FISH wurden nur für die Detektion von großen genomischen Deletionen im *TSC2*-Gen angewandt.



## 2.4 ERHOBENE PARAMETER

Erhoben wurden folgende Parameter zur statistischen Auswertung:

molekulargenetische Daten/Parameter:

- krankheitsverursachende Mutation
  - Genlokus: *TSC1* oder *TSC2*, Exon
  - Mutationsart (siehe 2.5.2)
  - Zusätzliche Deletion im Bereich von *PKD1*
- unklassifizierte Variante (Pathogenität unklar)
- apathogener Polymorphismus
- NMI (No Mutation Identified)
- molekulargenetische Methode, mittels derer die Mutation identifiziert wurde
- familiärer Erbgang oder spontan entstandene Mutation

klinische Manifestationen des Krankheitsbildes:

- Diagnosekriterien (Haupt – und Nebenkriterien, modifiziert nach Roach et al. [83], erhoben mit standardisiertem Fragebogen (siehe 2.2.2 und Appendix)

**Tabelle 6 Erhobene klinische Parameter**

Hauptkriterien	Nebenkriterien
Faziale Angiofibrome oder Stirnplaque	Mehrere, zufällig verteilte Zahnschmelzdefekte
Nicht-traumatische Nagelfalztumore	Hamartomartige Rektumpolypen
Drei oder mehr hypomelanotische Flecken	Knochenzysten
Chagrin-Haut (Bindegewebsnävus)	Radiale Heterotypien der weißen Hirnsubstanz
Kortikale Tubera	Zahnfleischfibrome
Subependymale Knoten	Hamartome außerhalb der Niere
Riesenzellastrozytom	Unpigmentierter Fleck der Netzhaut.
Multiple Hamartome der Netzhaut	Konfettflecken der Haut
Kardiale Rhabdomyome (einzeln oder mehrere)	Multiple Nierenzysten
Pulmonale Lymphangioliomyomatose	
Renale Angiomyolipome	

- zusätzliche durch die Krankheit bedingte Manifestationen (Epilepsie, Autismus, mentale Retardierung). Diese konnten jedoch aufgrund der fehlenden Standardisierung nicht statistisch ausgewertet werden.
- Gesicherte Diagnose oder Verdachtsdiagnose gemäß vorliegender Haupt- und Nebenkriterien (betroffen, Verdacht auf)
- Fehlende klinische Information und fehlendes Vorliegen von Symptomen (klinische Information nicht vorhanden, keine klinischen Symptome)

Epidemiologische Angaben:

- Alter zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Analyse; bei positivem Mutationsnachweis zum Zeitpunkt der Erhebung des pathologischen Befundes
- Herkunft
- Geschlecht

## 2.5 AUSWERTUNGEN

Für die Befunddokumentation beziehungsweise -sichtung, aber vor allem auch für die Diskussion der Genotyp-Phänotyp-Korrelation, ist es wichtig beide Kategorien, also Genotyp und Phänotyp, zu definieren. Hierbei fällt es insbesondere schwer, dies für den Phänotyp und ihre Erscheinungsformen zu definieren. Mangels einheitlicher Vorgaben macht dies besonders beim Schweregrad des krankhaften Phänotyps Probleme.

### 2.5.1 DEFINITION DES PHÄNOTYPS

Insgesamt wird der Phänotyp durch sämtliche klinischen Manifestationen bestimmt. Diese umfassen vorwiegend die veröffentlichten Diagnosekriterien, aber auch die neuropsychiatrischen Manifestationen, wie Autismus, Lernschwierigkeiten, mentale Retardierung und vieles mehr. Auch sämtliche Formen der Epilepsie, die bei TSC vorkommen können, sind Teil des Phänotyps. Da aber in der vorliegenden Arbeit nur die klinischen Haupt- und Nebenkriterien mittels Fragebogen standardisiert erhoben wurden, erfolgte die statistische Auswertung und weitere Betrachtung ebenfalls nur bezüglich dieser klinischen Kriterien. Daher definiert sich der Phänotyp in dieser Arbeit, dessen Korrelation mit dem Genotyp ich diskutieren werde, über die in Tabelle 6 aufgeführten Haupt- und Nebenkriterien. Zur Korrelation stellt sich zudem die Frage, was „schwer“ betroffen, was „leicht“ betroffen heißt. Eine offizielle, einheitliche Graduierung war bei der Literaturrecherche nicht zu finden. Im Großteil der Publikationen werden vor allem diejenigen Fälle als schwerwiegend oder schlimmer bezeichnet, die:

- Besonders früh, also in jungem Alter erkranken
- Eine Epilepsie entwickeln
- Unter einer mentalen Retardierung leiden
- Ein subependymales Riesenzell-Astrozytom (SEGA) entwickeln
- Kortikale Tubera aufweisen
- Eine (schwere) Nierenbeteiligung zeigen.

Eine Möglichkeit ist, die Schwere der Erkrankung entsprechend der Lebensqualität zu graduieren. Ebenso sinnvoll ist es, medizinische Komplikationen, die potentiell lebensbedrohlich sind, wie z.B. Blutungen im Bereich von renalen Angiomyolipomen, einzubeziehen.

In den meisten Publikationen wird der Schweregrad an den neurologischen Manifestationen "gemessen", da diese die größte Einschränkung im Alltag mit sich bringen, gefolgt von der Beteiligung innerer Organe, die v.a. durch die Komplikationen problematisch werden kann. Ähnlich soll auch in der vorliegenden Arbeit die Schwere eingeteilt werden. Zusätzlich wird noch die Häufigkeit berücksichtigt, mit der eine Manifestation auftritt.

### 2.5.2 DEFINITION DES GENOTYPS

TSC entsteht durch eine Mutation im *TSC1* oder im *TSC2* Gen. Der Genotyp ist hier durch die HGVS-Nomenklatur (Human Genome Variation Society) definiert [23] (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>).

Die Mutationen werden in folgende Gruppen eingeteilt:

- **Missense:** Nukleotidaustausche, die zu einem Aminosäureaustausch führen.
- **Nonsense:** Nukleotidaustausche, die statt einer Aminosäure ein "Stop-Signal" kodieren.
- **Insertionen:** zusätzlich eingefügte Nukleotide, führt oft zum Verschieben des Leserasters (Frame shift).
- **Deletionen:** Verlust von Nukleotiden, führt oft zum Verschieben des Leserasters (Frame shift).
- **Spleiß-Mutation (Splice-Mutation):** Mutationen, die das Signal für den Zusammenbau von Exons bei der mRNA-Reifung verändern
- **Indel (Insertion + Deletion):** gleichzeitiger Verlust von Nukleotiden und Ersatz durch andere Nukleotide (meistens auch Frame shift).
- **In-Frame:** Leseraster wird durch zusätzliche Nukleotide (Anzahl von drei oder Vielfaches von drei) oder Verluste nicht verändert.
- **Genomische Deletion:** Verlust großer Teile genomischer DNA.
- **Genomische Duplikation:** Zugewinn großer Teile genomischer DNA

[89]

### 2.5.3 STATISTISCHE METHODEN

Die Daten wurden mit Hilfe des Programms „IBM SPSS Statistics 20“ statistisch ausgewertet. Es wurden der "Fisher's exact test" bzw. „ $\chi^2$  Test“ für den Vergleich kategorischer Daten und der „Mann-Whitney-Test“ für den Vergleich des medianen Alters verwendet. Die Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0.05 angenommen.

Einschlusskriterien für die Messung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation:

- dokumentierte klinische Diagnose TSC
- Nachgewiesene pathogene TSC1- oder TSC2-Mutation
- umfassende molekulargenetische Untersuchung mit mehreren Methoden bei Patienten, bei denen anfänglich keine Mutation nachgewiesen werden konnte

Ausschlusskriterien für die Messung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation:

- unzureichende klinische Information
- fehlendes Einverständnis des Patienten.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 ALLGEMEINE CHARAKTERISIERUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS

Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Gesamtkollektiv umfasst insgesamt 1368 Patienten (633 Männer, 677 Frauen, 58 ungeborene Kinder aus Pränataldiagnostik), die in einem Zeitraum von ca. 16 Jahren, zunächst am Humangenetischen Institut des Klinikums der Friedrich Alexander Universität Erlangen, ab dem Jahr 2001 am Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ) in Martinsried, in der molekulargenetischen Routinediagnostik untersucht wurden.

Die Anzahl der im Weiteren betrachteten Indexpatienten beläuft sich auf 710 Personen, unter denen bei 497 TSC sporadisch auftrat und 97 Patienten eine positive Familienanamnese für TSC haben. Von den übrigen 116 Indexpatienten liegt keine Information bezüglich der Familienanamnese hinsichtlich der Erkrankung vor (siehe Tabelle 7). Bei den untersuchten Indexpatienten sind beide Geschlechter etwa gleich verteilt (siehe Tabelle 7), bei 1,8% der Untersuchten war zum Zeitpunkt der Diagnostik kein Geschlecht bekannt, da es sich um Pränataldiagnostik handelte.

Bei 63,1% (448/710) der Indexpatienten konnte bereits aufgrund der Symptome eine sichere klinische Diagnose entsprechend den klinischen diagnostischen Kriterien von 1998 [83] gestellt werden, bei 36,1% (156/710) bestand lediglich eine wahrscheinliche oder mögliche klinische Diagnose. Diese beiden Kategorien wurden in der weiteren Auswertung unter "Verdacht auf (V.a.)" subsumiert. Von 6 Patienten war keine Information zur klinischen Diagnose bekannt, aufgrund fehlender Angaben zur Symptomatik.

Tabelle 7 Indexpatienten

	Anzahl Index	%
<b>Insgesamt</b>	<b>710</b>	<b>100</b>
Sporadisch	497	70,0
Familiär	97	13,7
Vererbung unbekannt	116	16,3
Männer	352	49,6
Frauen	345	48,6
Ungeborene	13	1,8
Betroffen	448	63,1
Verdacht auf (V.a.)	256	36,1
Keine klinische Information	6	0,8

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Diagnostik lag bei 14,67 Jahren (SD 15,072), im Median bei 10,00 Jahren. Eine Normalverteilung konnte hierbei nicht beobachtet werden. Die Altersverteilung entspricht einer rechts-schiefen Verteilung (siehe Abbildung 8).

Das Alter der ungeborenen, pränatal untersuchten Kinder wurde mit "-1" eingetragen. So reicht die Spannweite des Alters in der Patientengruppe von -1 bis 72 Jahren (siehe Tabelle 8). Von 106 (14,9%) der Indexpatienten, konnte das Alter nicht ermittelt werden. Aus Gründen der leichteren Übersichtlichkeit wurde zudem in Tabelle 8 eine Gruppierung in fünf Altersklassen vorgenommen. Dabei

fällt ein Häufigkeitsgipfel in der Gruppe der pränatal Untersuchten (-1) bis Fünfjährigen mit einem Anteil von 246 Patienten auf.

Abbildung 8 Altersverteilung

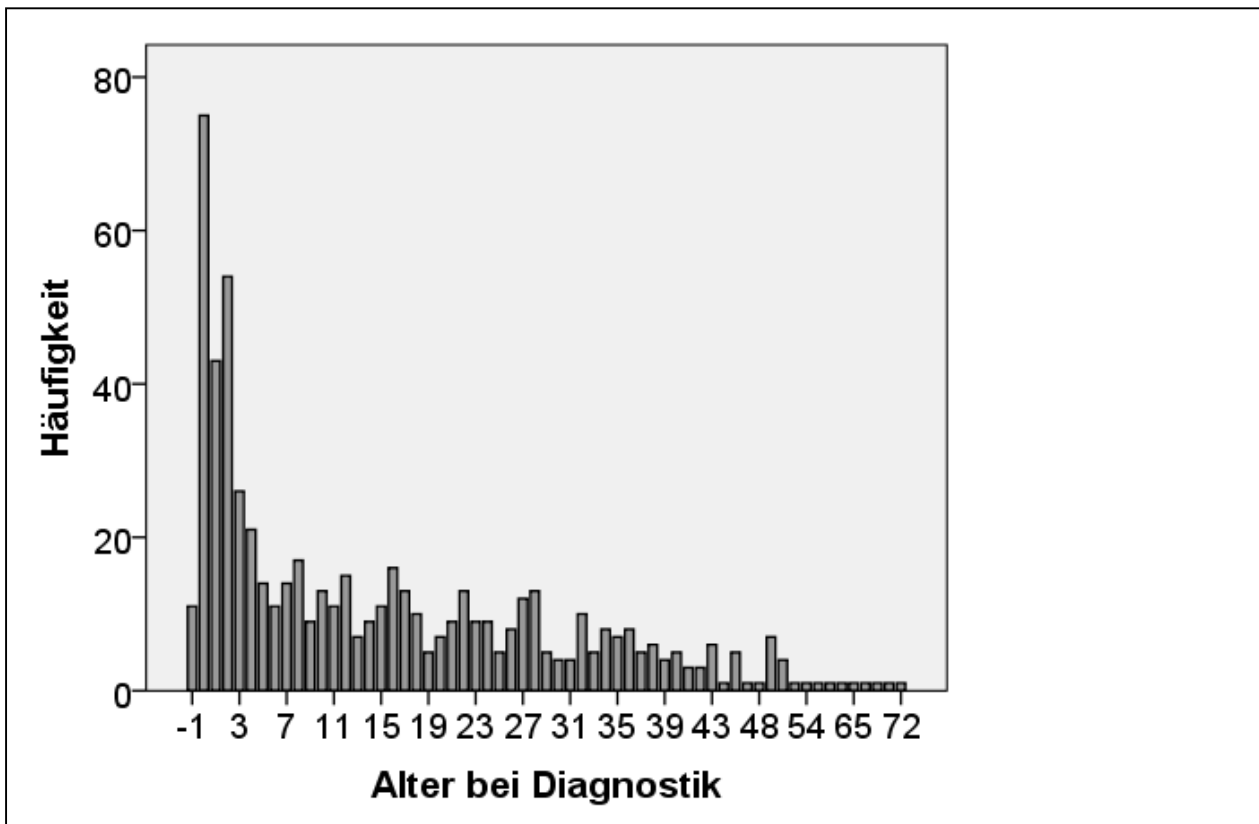


Tabelle 8 Alter in Jahren

	Index	%
Alter bekannt	604	85,1
Alter unbekannt	106	14,9
Medianes Alter	10,00	
Durchschnittsalter (SD)	14,67 (15,072)	
Spannweite	-1 bis 72	
-1 bis 5 J	246	34,6
6 bis 10 J	64	9,0
11 bis 15 J	53	7,5
16 bis 25 J	96	13,5
>25 J	145	20,4

Informationen zur ethnischen Herkunft der Untersuchten lagen bei 78,6% der Indexpatienten vor. Der Großteil davon stammt mit 529 Personen aus Westeuropa, 494 Erkrankte alleine aus Deutschland (siehe Tabelle 9), nur 3,7% haben ihre Herkunft in Osteuropa, 0,4% der Indexpatienten waren keine Europäer.

Tabelle 9 Herkunft Indexpatienten

	Index	%
Unbekannt	152	21,4
Arabien	2	0,3
Dänemark	1	0,1
Deutschland	494	69,6
Frankreich	1	0,1
Griechenland	2	0,3
Indonesien	1	0,1
Italien	6	0,8
Kosovo	1	0,1
Österreich	21	3,0
Polen	1	0,1
Schweiz	2	0,3
Spanien	1	0,1
Türkei	21	3,0
Großbritannien	1	0,1
Ukraine	2	0,3
Weißrussland	1	0,1

## 3.2 GENOTYPISCHE BESCHREIBUNG DES KOLLEKTIVS

### 3.2.1 MUTATION IDENTIFIZIERT (MI), MUTATION NICHT IDENTIFIZIERT (NMI), *TSC1* UND *TSC2*

Bei allen 710 Indexpatienten wurde eine molekulargenetische Untersuchung zum Auffinden der krankheitsverursachenden Mutation durchgeführt. Die Erfolgsrate liegt bei 51,0%, das heißt bei 362 Untersuchten war eine Mutation nachweisbar (MI). Für 348 Indexpatienten, das entspricht 49,0%, konnte bisher keine eindeutig pathogene Mutation identifiziert werden (NMI). Im Indexkollektiv fanden sich neun Patienten, also 1,3%, die zusätzlich zu einer *TSC2*-Deletion eine *PKD1*-Deletion aufwiesen und damit an einem *TSC2/PKD1* Contiguous-Gene-Syndrom erkrankt sind (siehe Tabelle 10).

Bei den 448 Indexpatienten mit gesicherter klinischer Diagnose allerdings lag die Mutationsdetektionsrate bei 61,8%

**Tabelle 10 MI und NMI**

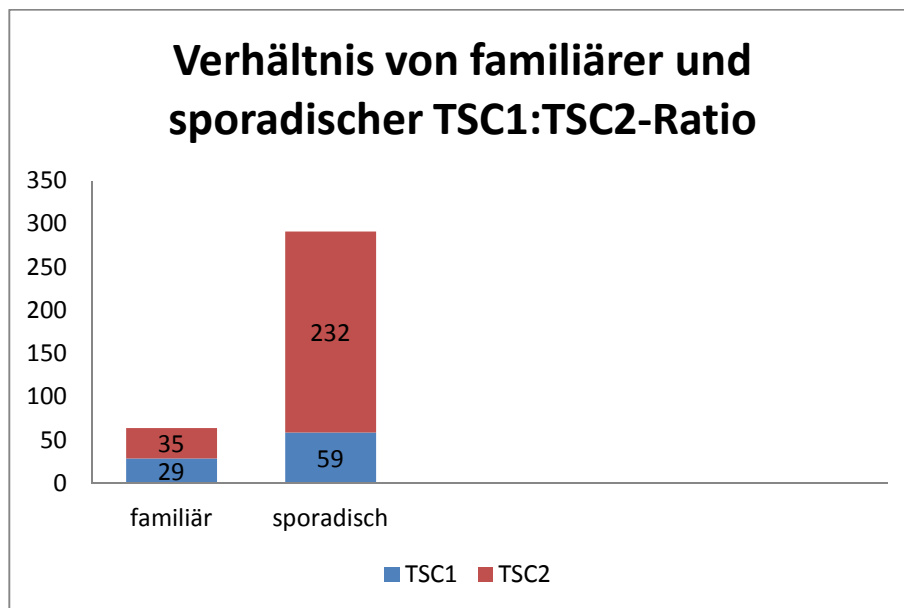
	Anzahl	%
MI	362	51,0
↳ PKD1	↳ 9	↳ 1,3
NMI	348	49,0
<b>Total</b>	<b>710</b>	<b>100,0</b>

Von den 362 Erkrankten mit nachweisbarer Mutation hatten nur 24,6% (89/362) Veränderungen im *TSC1*-Gen, aber 75,4 % (273/362) eine Mutation auf dem *TSC2*-Gen. Daraus ergibt sich in unserem untersuchten Kollektiv eine *TSC1*:*TSC2*-Ratio von 1:3.

64 Patienten mit positivem Mutationsnachweis hatten eine positive Familienanamnese mit mindestens einem positiv getesteten Anlageträger, dies entspricht 17,7%. Das Verhältnis von *TSC1* zu *TSC2* ist hier mit 29:35 fast ausgewogen (1:1). Im Gegensatz dazu ist die Ratio in den sporadischen Fällen deutlich zu Gunsten der *TSC2*-Mutationen verschoben. Es konnte bei 291 Personen, also 80,4%, eine de novo entstandene DNA-Veränderung festgestellt werden, 59 davon im *TSC1*-Gen und 232 im *TSC2*-Gen. Bei den sporadischen Fällen zeigt sich damit eine *TSC1*:*TSC2* Ratio von 1:4.

Der Unterschied zwischen familiärer *TSC1*:*TSC2*-Ratio (1:1) und sporadischer *TSC1*:*TSC2*-Ratio (1:4) ist mit einem p-Wert <0,001 hochsignifikant, wie auch Abbildung 9 veranschaulicht.

**Abbildung 9 TSC1:TSC2-Ratio**



### 3.2.2 UNKLASSIFIZIERTE VARIANTEN

Unklassifizierte Varianten wurden bei 11,3% der Indexpatienten gefunden, davon haben 11 Personen Varianten auf *TSC1*, 67 auf *TSC2* und 2 der Untersuchten zeigen auf beiden Genen Varianten. 47 von 362 Patienten des MI-Kollektivs (13%) haben zusätzlich zu ihrer krankheitsverursachenden Mutation eine Variante mit unklarer Pathogenität.

**Tabelle 11 Unklassifizierte Varianten**

	Anzahl	%
Variante auf <i>TSC1</i>	11	1,5
Variante auf <i>TSC2</i>	67	9,4
Varianten auf <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i>	2	0,3
<b>Total mit Variante</b>	<b>80</b>	<b>11,3</b>
Mutation PLUS Variante	47	13

### 3.2.3 IDENTIFIZIERTE MUTATIONSTYPEN

Insgesamt konnte in 362 Fällen eine für TSC ursächliche Mutation nachgewiesen werden. In den meisten Fällen war es möglich, die Mutationen einer Kategorie zuzuordnen, nur in wenigen Ausnahmefällen gelang dies nicht sicher. So zum Beispiel bei einigen DNA-Veränderungen, die formal Missense-Mutationen sind, jedoch zusätzlich eine Spleißkonsensussequenz verändern. Hier konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche Konsequenz bezüglich der Pathogenität die ausschlaggebende ist (Benennung: Missense/ Spleiß, Deletion/Spleiß). Einmalig konnte der Sonderfall nachgewiesen werden, dass zwei pathogene Mutationen bei einem Individuum detektiert wurden: es handelt sich um die Mutationen c.488\_489del + c.3986G>A / p.Phe163Cysfs\*25 + p.Arg1329His und somit eine Deletion und eine Missense-Mutation. In der folgenden Tabelle sind die detaillierten Mutationstypen und ihre jeweiligen Häufigkeiten sowie ihr Anteil an *TSC1* und *TSC2* aufgelistet.



Tabelle 12 Anteil der Mutationstypen an *TSC1* und *TSC2* bzw. der Gesamtheit MI

			Gen		Gesamtsumme
			<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>	
<b>Gesamtsumme</b>		<b>Anzahl</b>	89	273	362
		<b>% in Mutationstyp</b>	24,6%	75,4%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	100,0%	100,0%	100,0%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	24,6%	75,4%	100,0%
<b>Mutationstyp</b>	<b>Deletion</b>	<b>Anzahl</b>	21	48	69
		<b>% in Mutationstyp</b>	30,4%	69,6%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	23,6%	17,6%	19,1%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	5,8%	13,3%	19,1%
	<b>Deletion/Spleiß</b>	<b>Anzahl</b>	0	2	2
		<b>% in Mutationstyp</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	0,0%	0,7%	0,6%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,0%	0,6%	0,6%
	<b>Deletion+Missense</b>	<b>Anzahl</b>	0	1	1
		<b>% in Mutationstyp</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	0,0%	0,4%	0,3%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,0%	0,3%	0,3%
	<b>genomische Deletion</b>	<b>Anzahl</b>	1	23	24
		<b>% in Mutationstyp</b>	4,2%	95,8%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	1,1%	8,4%	6,6%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,3%	6,4%	6,6%
	<b>in frame Deletion</b>	<b>Anzahl</b>	0	4	4
		<b>% in Mutationstyp</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	0,0%	1,5%	1,1%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,0%	1,1%	1,1%
	<b>Indel</b>	<b>Anzahl</b>	1	5	6
		<b>% in Mutationstyp</b>	16,7%	83,3%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	1,1%	1,8%	1,7%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,3%	1,4%	1,7%
	<b>Insertion</b>	<b>Anzahl</b>	14	28	42
		<b>% in Mutationstyp</b>	33,3%	66,7%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	15,7%	10,3%	11,6%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	3,9%	7,7%	11,6%
	<b>Missense</b>	<b>Anzahl</b>	3	53	56
		<b>% in Mutationstyp</b>	5,4%	94,6%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	3,4%	19,4%	15,5%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,8%	14,6%	15,5%
	<b>Missense/Spleiß</b>	<b>Anzahl</b>	0	1	1
		<b>% in Mutationstyp</b>	0,0%	100,0%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	0,0%	0,4%	0,3%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	0,0%	0,3%	0,3%
<b>Nonsense</b>	<b>Anzahl</b>	37	57	94	
	<b>% in Mutationstyp</b>	39,4%	60,6%	100,0%	
	<b>% in Gen</b>	41,6%	20,9%	26,0%	

		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	10,2%	15,7%	26,0%
	<b>Spleiß</b>	<b>Anzahl</b>	12	51	63
		<b>% in Mutationstyp</b>	19,0%	81,0%	100,0%
		<b>% in Gen</b>	13,5%	18,7%	17,4%
		<b>% des Gesamtergebnisses</b>	3,3%	14,1%	17,4%

Zur besseren Auswertbarkeit und Anschaulichkeit wurden die detaillierten Mutations-Typen in Gruppen zusammengefasst. Tabelle 13 zeigt zunächst eine etwas differenziertere Gliederung. Für die späteren Genotyp-Phänotyp-Vergleiche wurde diese Unterteilung dann nochmals zu drei größeren Gruppen zusammengefasst: die gebräuchlichen Gruppen PT (Mutationen, die zu einer „Protein Truncation“, einer Protein-Verkürzung, führen), MS (Mutationen, die zu einer Aminosäure-Substitution führen) und große genomische Deletionen.

Die folgende Auflistung gibt einen Überblick, welche Mutationstypen in diesen drei Gruppen zusammengefasst wurden:

- **PT:** Nonsense, Insertion, Deletion, Indel, Spleiß  
Definition: keine Synthese oder die Synthese eines verkürzten und damit nicht mehr funktionellen Proteins.
- **MS:** Missense, In-Frame  
Definition: Synthese eines nicht (oder nur minimal) in der Länge, aber in der Aminosäuresequenz veränderten Proteins.
- **genomische Deletion**  
Definition: Verluste größerer Genbereiche beziehungsweise eines gesamten Genes und angrenzender Bereiche.

Tabelle 13 Einteilung der Mutationsgruppen

Mutationsgruppen innerhalb MI	Häufigkeit	Prozent
Missense	56	15,5
Nonsense	94	26,0
In-Frame	4	1,1
Frameshift	117	32,3
Spleiß-Mutationen	66	18,2
größere genomische Rearrangements	24	6,6
Deletion+Missense	1	0,3
<b>Gesamt</b>	<b>362</b>	<b>100</b>

- **Frame shift**  
Insertion, Deletion, Indel
- **In-Frame**  
Insertionen und Deletionen ohne Leserasterverschiebung
- **Spleiß-Mutationen**  
Spleiß, Deletion/Spleiß, Missense/Spleiß
- **Genomische Rearrangements**  
genomische Deletion, PKD1-Deletion, genomische Duplikation
- **1 Sonderfall: Deletion + Missense**

Wie das Kreisdiagramm in Abbildung 10 zeigt, finden sich auf dem *TSC1*-Gen überwiegend Nonsense- (41,57% von 89 *TSC1*) und Frameshift-Mutationen (40,45% von 89 *TSC1*), sowie an dritter Stelle Spleiß-Mutationen (13,5%). Bei einem Fall konnte eine genomische Deletion im *TSC1*-Gen nachgewiesen werden. Entsprechend den bisherigen Annahmen zur Verteilung der Mutationstypen über *TSC1* und *TSC2*, wurde auch in der vorliegenden Kohorte in nur sehr wenigen Fällen – drei Personen (3,4%) - eine Missense-Mutation in *TSC1* identifiziert.

Für das *TSC2*-Gen konnte gezeigt werden, dass Nonsense-, Missense- und Spleiß-Mutationen zu annähernd gleichen Teilen von fast 20% zu finden waren. Mit 29,67% machten die Frameshift-Mutationen auf dem *TSC2*-Gen den Hauptanteil aus. Aus der Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass In-Frame-Veränderungen mit 1,5 % einen äußerst geringen Anteil der gefundenen Mutationen ausmachen. Bei einer Person zeigte sich der bereits oben erwähnte Sonderfall zweier verschiedener pathogener Mutationen auf dem *TSC2*-Gen, einer Deletion und einer Missense-Mutation.

Abbildung 10: Häufigkeit der Mutationstypen in *TSC1* in Prozent

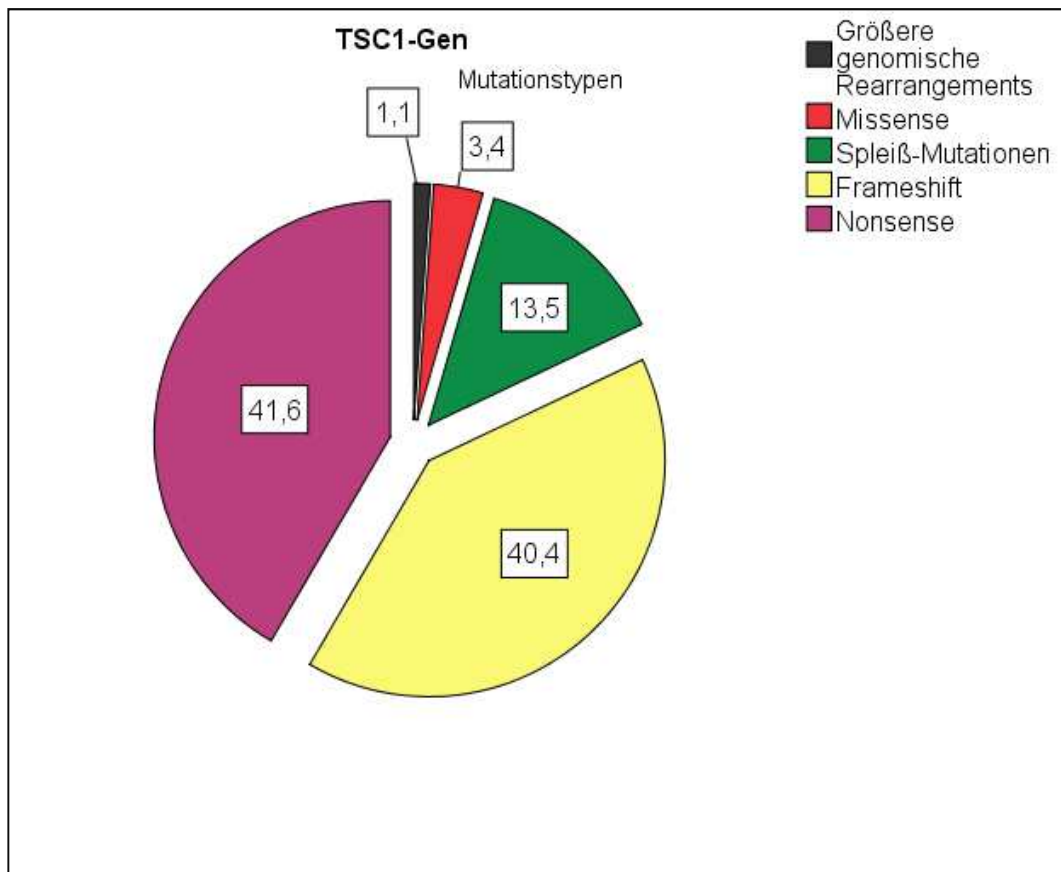
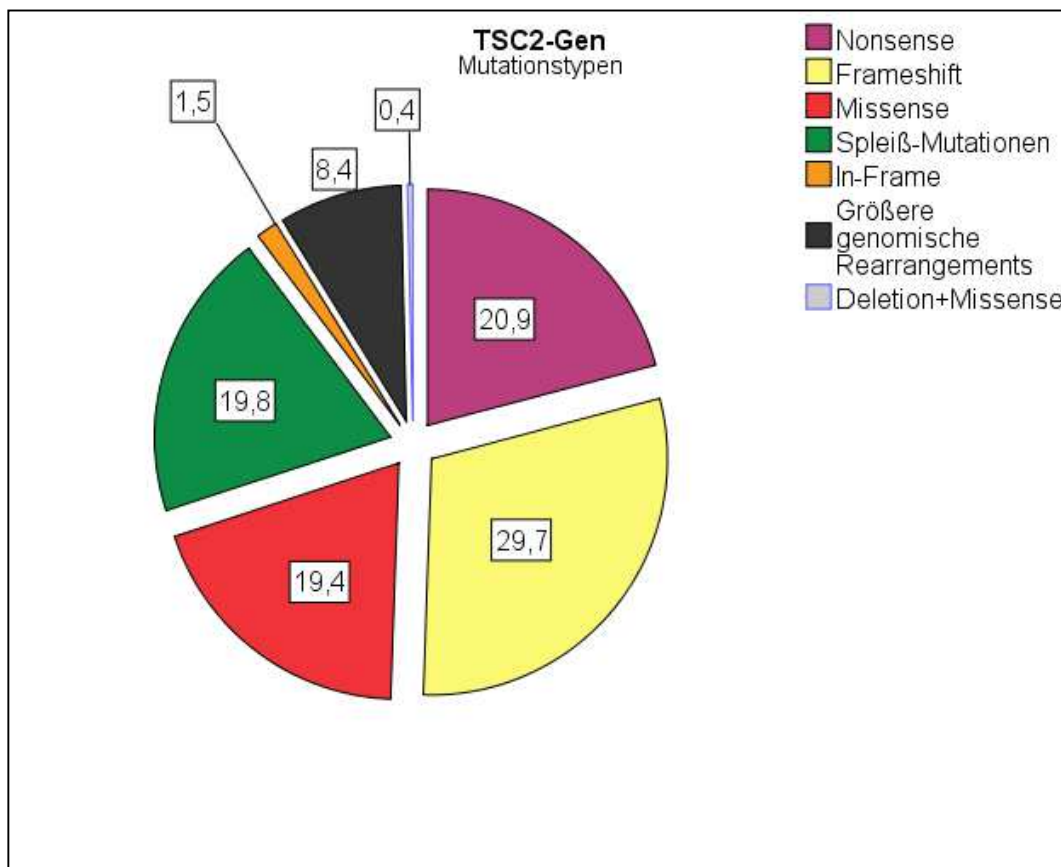


Abbildung 11: Häufigkeit der Mutationstypen in *TSC2* in Prozent



### 3.2.4 MUTATIONSVERTEILUNG ÜBER DIE EXONS DES *TSC1*- UND *TSC2*-GENS

Im *TSC1*-Gen waren die meisten DNA-Veränderungen mit 23 von 89 Mutationen (25,8%) in Exon 15 nachzuweisen, dem größten *TSC1*-Exon. Am zweithäufigsten sind Exon 9 und 18 mit jeweils 8 Mutationen (9%) betroffen. Exon 8, Exon 17 und Exon 21 finden sich mit jeweils 6 Mutationen (6,7%) an dritter Stelle. In folgenden Exons konnte keine DNA-Veränderung identifiziert werden: Exon 2, 3, 11, 16, 19, 20, 22, 23.

Im *TSC2*-Gen waren am häufigsten die Exons 16, 33 und 40 betroffen. An erster Stelle steht auch hier das größte Exon 33 mit insgesamt 21 Mutationen (7,7%), im Exon 40 waren 15 von 273 Mutationen (5,5%) nachweisbar, und in Exon 16 an dritter Stelle 12 Mutationen (4,4%). Keine Mutationen konnten in den Exons 2 und 6, sowie in den alternativ gespleißten Exons 25 und 31 gefunden werden.

Die Abbildungen 12 und 13 geben einen Überblick über die Verteilung der einzelnen Mutationstypen über die Exons der Gene *TSC1* und *TSC2*.

Abbildung 12 Art und Verteilung der identifizierten Mutationen im *TSC1*-Gen, Stand 2011 ©Dr. K. Mayer

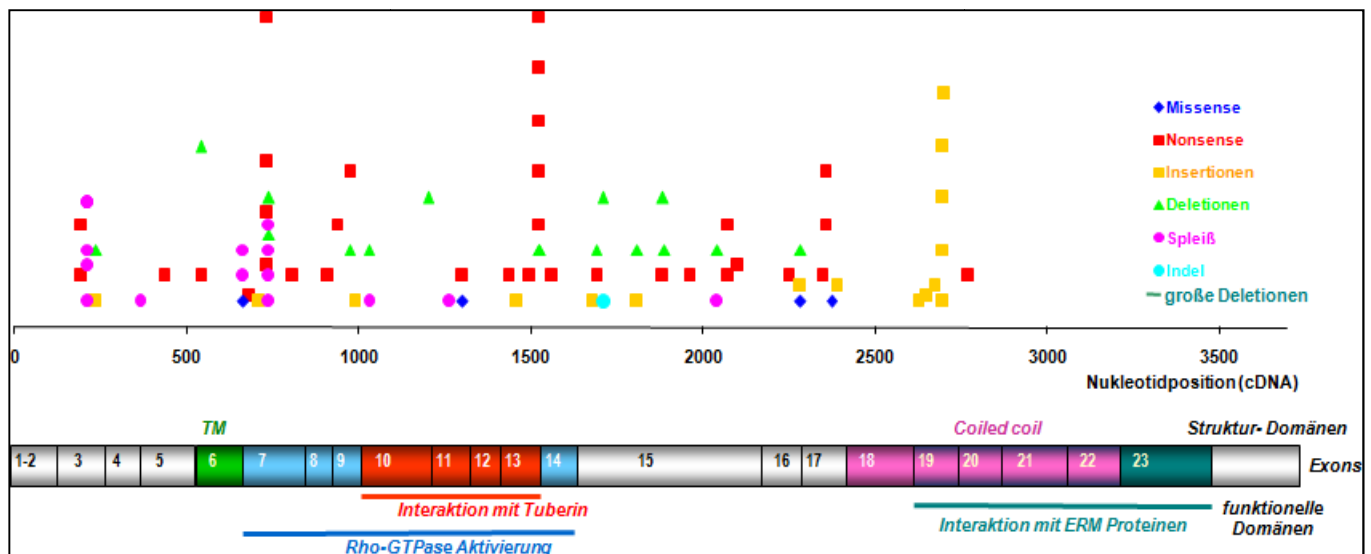
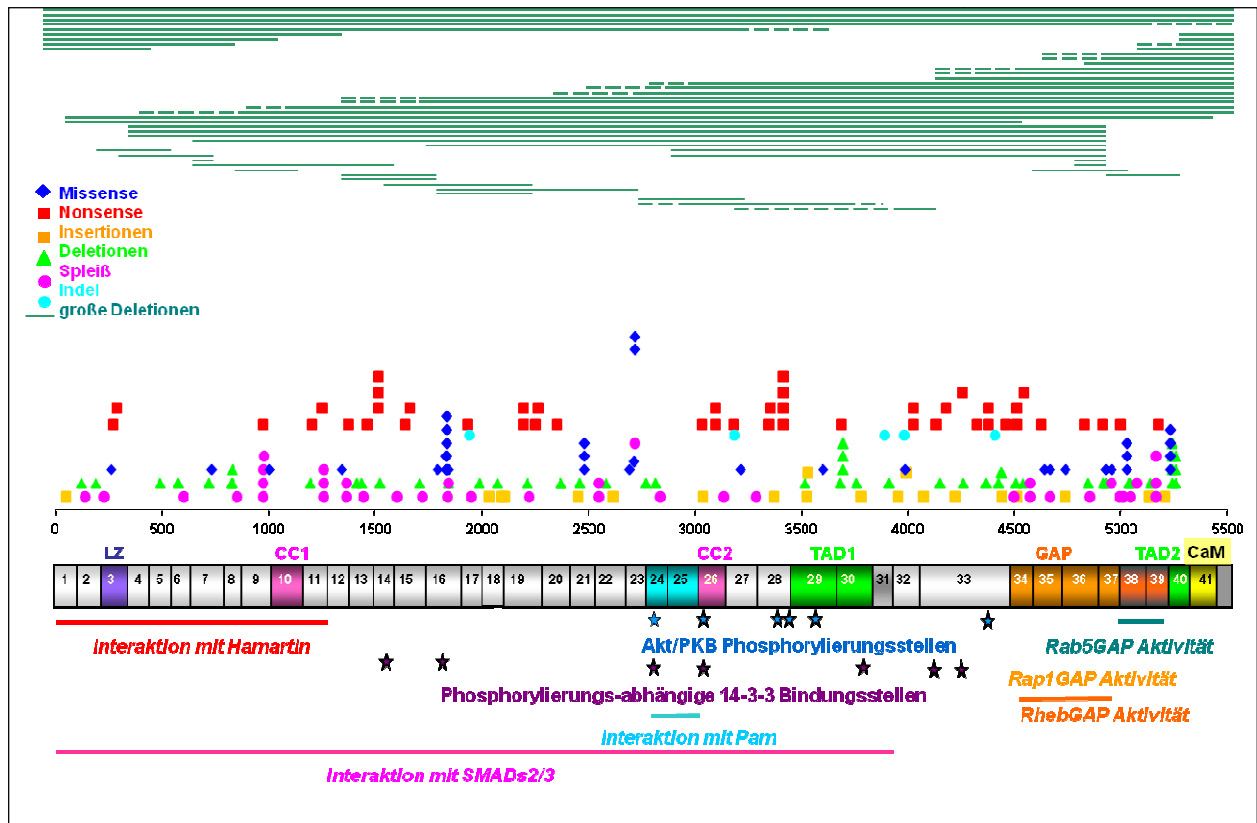


Abbildung 13 Art und Verteilung der identifizierten Mutationen im TSC2-Gen, Stand 2011 ©Dr. K. Mayer



### 3.2.5 AUSGEWÄHLTE MUTATIONEN

In diesem Kapitel werden die Mutationen aufgelistet, die bisher noch nicht veröffentlicht wurden und somit als neu entdeckte DNA-Veränderungen angenommen werden dürfen. Die Recherche bezüglich der Publikation von Mutationen beruht im Wesentlichen auf Sichtung der Leiden Open Variation Database LOVD ([chromium.liacs.nl](http://chromium.liacs.nl)). Die Tabelle 25 in Kap 7.4 des Anhangs zeigt alle neu gefundenen Mutationen auf dem Stand vom 08.06.2015 (14:01 Uhr).

### 3.2.6 ÜBERBLICK ÜBER DIE RESULTATE DER VERWENDETEN MOLEKULARGENETISCHEN METHODEN

Während des gesamten Erfassungszeitraumes wurden die in 2.3 erläuterten Methoden verwendet. Betrachtet man den Erfolg im Auffinden von Mutationen, so zeigt sich, dass in den letzten Jahren besonders die Sequenzierung einen hohen Stellenwert einnimmt (siehe Abbildung 14). Insgesamt konnten 74,3% (269/362) der pathogenen DNA-Veränderungen mittels Sanger-Sequenzierung identifiziert werden. Es besteht eine starke Abhängigkeit zwischen der gewählten Methode und der Wahrscheinlichkeit, eine Mutation zu finden ( $p < 0,001$ ). In einem Viertel der MI-Gruppe gelang der Mutations-Nachweis durch Screening-Methoden, die der Sequenzierung vorausgingen, wobei der Hauptanteil durch den Protein Truncation Test (38/362; 10,5%) und DHPLC (17/362; 4,7%) (jeweils im TSC2-Gen) gebildet wird. Größere genomische Rearrangements wurden überwiegend mit MLPA (17/362; 4,7%) identifiziert. Seit 2012 wurde die neue Möglichkeit des Next Generation Sequencing genutzt, wodurch bei sechs Patienten (1,7%) die krankheitsverursachende Mutation identifiziert werden konnte.

Einen Zusammenhang zwischen der angewandten Methode und der damit nachgewiesenen DNA-Veränderung zeigt die folgende Tabelle 14. Von den 24 genomischen Deletionen konnten 17 (70,8%) mit Hilfe von MLPA nachgewiesen werden.

Abbildung 14 Prozentualer Anteil der erfolgreich angewandten Methoden

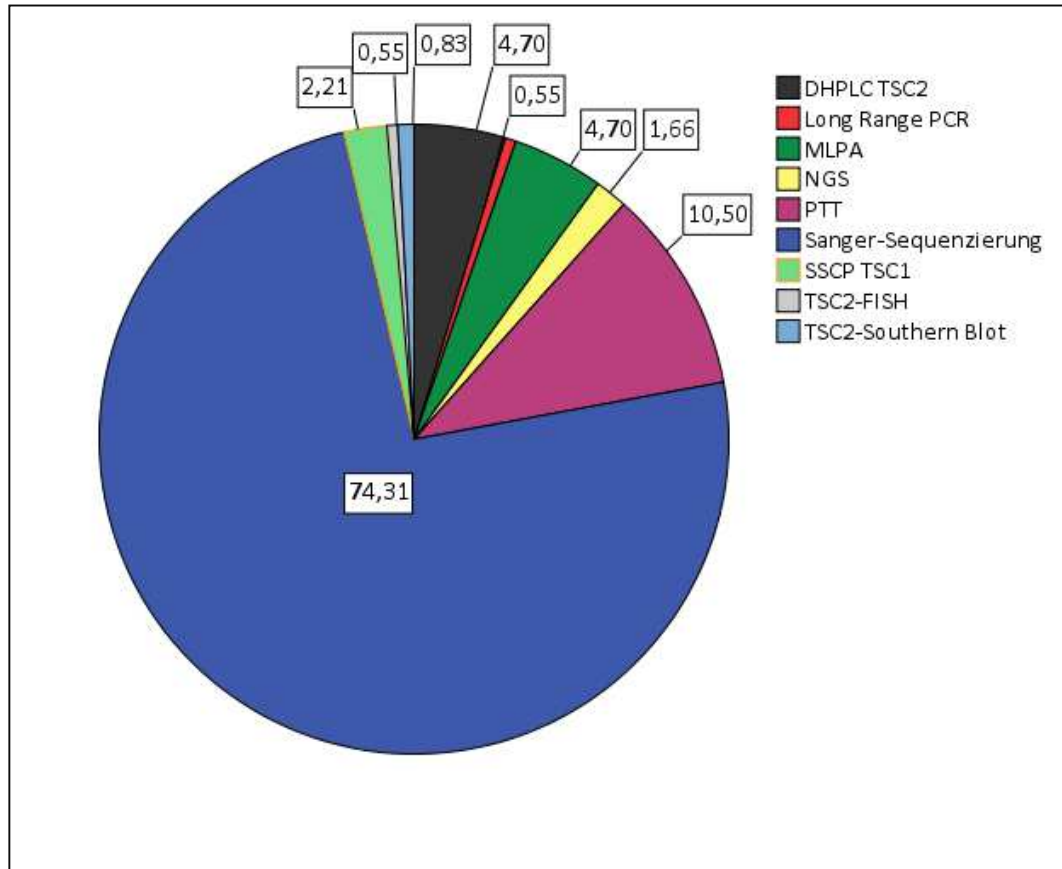


Tabelle 14 Methoden und Mutationstypen

	DHPLC TSC2	Long Range PCR	MLPA	NGS	Sanger-Sequenzierung	SSCP TSC1	PTT	TSC2-FISH	TSC2-Southern Blot	Gesamtsumme
<b>Missense</b>	8	0	0	2	46	0	0	0	0	<b>56</b>
<b>Nonsense</b>	0	0	0	0	78	2	13	0	0	<b>94</b>
<b>In-Frame</b>	1	0	0	0	3	0	0	0	0	<b>4</b>
<b>Frameshift</b>	6	0	0	0	91	6	14	0	0	<b>117</b>
<b>Spleiß</b>	2	0	0	3	50	0	11	0	0	<b>66</b>
<b>Großes, Rearrangement</b>	0	2	17	1	0	0	0	2	3	<b>24</b>
<b>Deletion+ Missense</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	<b>1</b>
<b>Gesamtsumme</b>	<b>17</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>6</b>	<b>269</b>	<b>8</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>362</b>

### 3.3 PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG DES KOLLEKTIVS

In die phänotypische Betrachtung des Kollektivs gehen die 710 Indexpatienten ein. Von 486 (68,5%) Patienten lagen klinische Informationen bezüglich der von Roach definierten Haupt- und Nebenkriterien [83] vor. Insgesamt fehlten - entsprechend den Diagnosekriterien - bei 31,5% (224/710) Informationen zur klinischen Symptomatik. Ausgewertet wurden die klinischen Daten, die gemäß des Erhebungsbogens in Kapitel 2.4. akquiriert werden konnten.

Eine Erläuterung der im Folgenden verwendeten Abkürzungen für die klinischen Kriterien findet sich zur besseren Übersichtlichkeit hier (siehe auch Abkürzungsverzeichnis):

#### Hauptkriterien

FA	Facial angiofibromas	Faziale Angiofibrome
HM	Hypomelanotic macules	Hypomelanotische Flecken
SP	Shagreen patch	Chagrin Haut
UF	Ungual fibromas	Nagelfalzfibrome
TUB	Cortical Tubers	Kortikale Tubera
SEN	Subependymal nodules	Subependymale Knoten
SEGA	Subependymal giant cell astrocytoma	Riesenzellastrozytome
AML	Angiomyolipomas	Angiomyolipome
RH	Retinal hamartoma	Retinale Hamartome
CRM	Cardiac rhabdomyomas	Kardiale Rhabdomyome
LAM	Lymphangioliomyomatois	Lymphangioliomyomatois

#### Nebenkriterien

CON	Confetti skin lesions	Konfettiflecken
CRML	Cerebral white matter radial migration lines	Radiale Heterotopien der weißen Substanz
RC	Renal cysts	Nierenzysten
AP	Retinal achromatic patches	Achromatischer Fleck der Netzhaut
GF	Gingival fibromas	Zahnfleischfibrome
DEP	Dental enamel pits	Zahnschmelzdefekte
RP	Rectal polyps	Hamartomartige Rektumpolypen
HAM	Nonrenal hamartoma	Extrarenale Hamartome
BC	Bone cysts	Knochenzysten



### 3.3.1 ZENTRALNERVÖSE SYMPTOME

In diesem Abschnitt werden folgende klinische Manifestationen betrachtet: Tubera der Hirnrinde (TUB), subependymale Gliaknoten (SEN), Riesenzellastrozytom (SEGA) und radiale Heterotopien in der weißen Hirnsubstanz (CRML). Außerdem erwähnt werden Epilepsien (SZ), mentale Retardierung (MR) und Autismus (AT). Da diese zusätzlichen Symptome nicht explizit in unserem Erhebungsbogen erfragt wurden und nur in einigen Fällen ergänzend angegeben wurden, kann nicht von repräsentativen Ergebnissen ausgegangen werden. In der Genotyp-Phänotyp-Korrelation werden sie daher nicht ausgewertet.

Tubera der Hirnrinde zeigten sich bei 45,7% (222/486) der Patienten, subependymale Gliaknoten in 31,9% der Fälle und Riesenzellastrozytome in 9,1%. 4,9% der Untersuchten wiesen das Nebenkriterium Heterotopien in der weißen Hirnsubstanz auf.

Für 38,1% der Patienten wurde angegeben, dass sie an einer Epilepsie litten. Bei 13,8% lag die zusätzliche Information einer mentalen Retardierung vor. 1,4% der Untersuchten zeigten laut Angaben autistische Züge. Wie oben bereits erwähnt, ist hier jedoch nicht von repräsentativen Zahlen für eine Grundgesamtheit auszugehen.

### 3.3.2 DERMATOLOGISCHE SYMPTOME

Zu den hier ausgewerteten Hautmanifestationen zählen faciale Angiofibrome oder Stirnplaque (FA), drei oder mehr hypomelanotische Flecken (HM), Chagrin-Haut (SP) und nichttraumatische Nagelfalztumore (UF) als Hauptkriterien. Nebenkriterium sind Konfettiflecken (CON). 37,0% (180/486) der Indexpatienten hatten faciale Angiofibrome, 53,3% hypomelanotische Flecken und 12,8% zeigten eine Chagrin-Haut. Bei 11,9% konnten Nagelfalztumore beobachtet werden. Konfettiflecken fanden sich bei 7,4%.

### 3.3.3 NEPHROLOGISCHE SYMPTOME

Ausgewertet wurde die Häufigkeit von Angiomyolipomen der Niere (AML) und von Nierenzysten (RC). Außerdem wurde das Vorkommen eines TSC2/PKD1 Contiguous Gene Syndrome bewertet.

In 24,3% (118/486) der Fälle konnten Angiomyolipome als Hauptkriterium und in 11,9% renale Zysten als Nebenkriterium nachgewiesen werden. Innerhalb der Gesamtgruppe wurde bei neun Patienten (1,9%) mit den klinischen Zeichen eines Contiguous Gene Syndroms eine große genomische TSC2-Deletion identifiziert, die zusätzlich das PKD1-Gen betrifft.

### 3.3.4 KARDIALE SYMPTOME UND LUNGENBETEILIGUNG

Es zeigten sich bei 32,1% (156/486) der untersuchten Personen kardiale Rhabdomyome (CRM). Die pulmonale Lymphangioleiomyomatose (LAM) trat bei 4,7% (23/486) auf.

### 3.3.5 ÜBRIGE DIAGNOSEKRITERIEN

Im folgenden Absatz wird auf die klinischen Kriterien eingegangen, die Augen, Zähne und Zahnfleisch, Manifestationen am GI-Trakt und das Skelett betreffen. Bis auf das Vorliegen von mehreren Hamartomen an der Netzhaut (RH), die als Hauptkriterium gewertet werden, zählen die übrigen zu den Nebenkriterien. Dabei handelt es sich um unpigmentierte Flecken auf der Netzhaut (AP),

Zahnfleischfibrome (GF), mehrere zufällig verteilte Zahnschmelzdefekte (DEP), hamartomartige Rektumpolypen (RP), Hamartome außerhalb der Niere (HAM) und Knochenzysten (BC).

Die retinalen Hamartome traten mit einer Häufigkeit von 7,2% (35/486), die achromatischen, retinalen Flecken mit einer Häufigkeit von 1,6% (8/486) auf. 4,3% (21/486) hatten Zahnfleischfibrome und 6,2% (30/486) Zahnschmelzdefekte. Rektumpolypen und Knochenzysten wurden insgesamt mit 0,4% (2/486) beziehungsweise 1,0% (5/486) äußerst selten aufgeführt. Hamartome außerhalb der Niere betrafen 5,6% (27/486) der Indexpatienten.

Einen Überblick über die Häufigkeit aller ausgewerteten Diagnosekriterien liefert Tabelle 15 (FA: Faziale Angiofibrome; HM: Hypomelanotische Flecken; SP: Shagreen-Flecken; UF: Unguale Fibrome; TUB: Tubera der Hirnrinde; SEN: Subependymale Knoten; SEGA: Subependymale Riesenzellastrozytome; AML: Angiomyolipome der Niere; RH: Retinale Hamartome; CRM: Kardiale Rhabdomyome; LAM: Pulmonale Lymphangioliomyomatose; CON: Konfettiflecken; CRML: Radiale Heterotopien der weißen Hirnsubstanz; RC: Nierenzysten; AP: Unpigmentierter Fleck der Retina; GF: Gingivafibrome; DEP: Zahnschmelzdefekte; RP: Rektumpolypen; HAM: Hamartome außerhalb der Nieren; BC: Knochenzysten).

**Tabelle 15 Häufigkeit der Diagnosekriterien**

Hauptkriterien	Anzahl	Prozent	Nebenkriterien	Anzahl	Prozent
FA	180	37,0	CON	36	7,4
HM	260	53,3	CRML	24	4,9
SP	62	12,8	RC	58	11,9
UF	58	11,9	AP	8	1,6
TUB	222	45,7	GF	21	4,3
SEN	155	31,9	DEP	30	6,2
SEGA	44	9,1	RP	2	0,4
AML	118	24,3	HAM	27	5,6
RH	35	7,2	BC	5	1,0
CRM	157	32,1			
LAM	23	4,7			

### 3.4 GENOTYP-PHÄNOTYP-KORRELATION

Ziel der Arbeit soll es sein, zu überprüfen, inwieweit eine Abhängigkeit des Phänotyps vom jeweiligen Genotyp besteht. Dafür wurden die einzelnen Diagnosekriterien bezüglich der einzelnen Parameter innerhalb des Patientenkollektivs auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft.

Betrachtet wurde der Einfluss des Geschlechts, der Familienanamnese (sporadisch oder familiär), des betroffenen Genes sowie der einzelnen Mutationstypen. Es wurde auch untersucht, ob ein positiver Mutationsnachweis (Mutation "ja" oder "nein") in Korrelation mit dem Phänotyp steht.

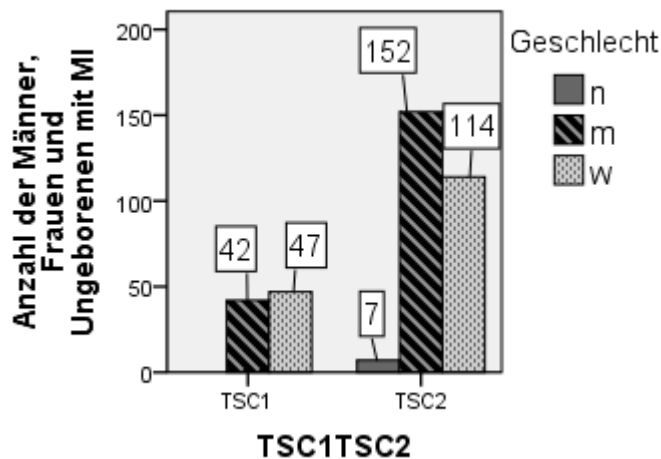
#### 3.4.1 MÄNNLICHE VERSUS WEIBLICHE PATIENTEN

In diesem Abschnitt wurden männliche und weibliche Patienten verglichen, um herauszufinden, ob es zwischen den Geschlechtern Unterschiede der auftretenden TSC-Symptome gibt.

Das mediane Alter von Männern (8,00 Jahre) und von Frauen (12,00 Jahre) unterschied sich nicht signifikant (p-Wert 0,168). Im Durchschnitt waren die männlichen Patienten 13,71 Jahre alt (SD 14,143)

und die Frauen 15,31(SD 15,157). Es konnte kein Unterschied in der Geschlechterverteilung zwischen Mutationen in den beiden Genen *TSC1* und *TSC2* gezeigt werden (p-Wert 0,081), wie Abbildung 15 veranschaulicht. Das Auftreten einer Mutation im *TSC1*- oder *TSC2*-Gen ist also unabhängig vom Geschlecht.

Abbildung 15 Geschlechterverteilung bzgl. *TSC1*- und *TSC2*-Mutationen



Auch für die Gruppen "familiär" und "sporadisch" zeigt sich kein signifikanter Unterschied der Geschlechter ( $p = 0,600$ ). Ebenso zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Geschlechter in Bezug auf die klinische Diagnosestellung mittels Diagnosekriterien ( $p = 0,240$ ). Zudem zeigen sich Männer und Frauen annähernd gleich verteilt hinsichtlich der Häufigkeit des Mutationsnachweises (MI und NMI;  $p = 0,081$ ).

Abbildung 16 Geschlechterverteilung in MI/NMI

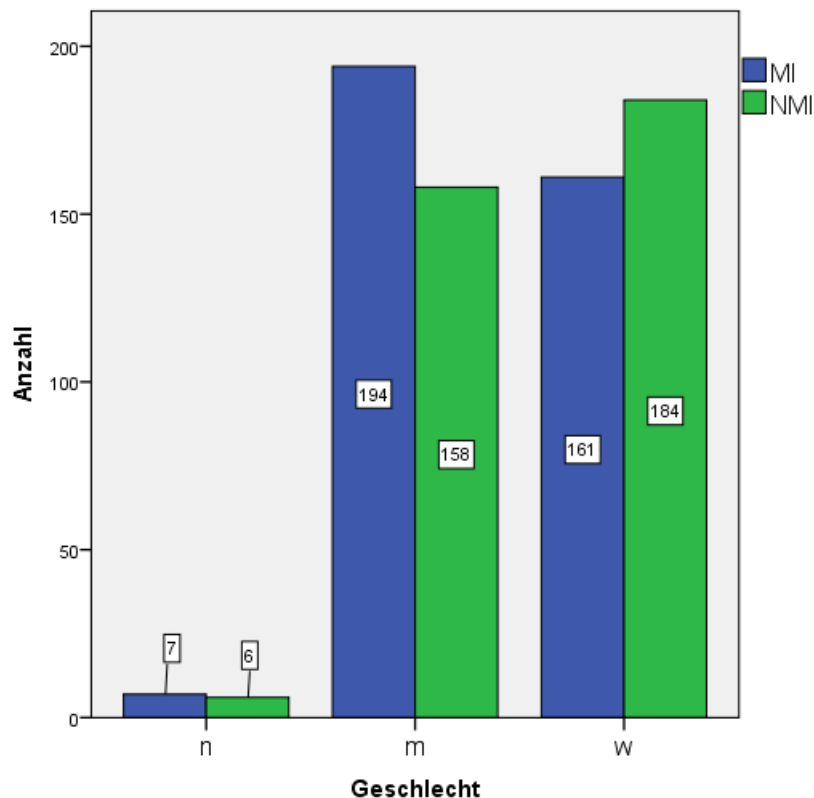


Tabelle 16 Männer versus Frauen versus Ungeborene

	Männer	Frauen	Ungeborene
<b>TSC1/TSC2</b>	42/152	47/114	0/7
<b>Betroffen/V.a.</b>	233/115	215/128	0/7
<b>Medianes Alter</b>	8,00	12,00	-1,00
<b>Durchschnittsalter(SD)</b>	13,71(14,143)	15,31(15,157)	-1,00(0,00)

Für die klinischen Haupt- und Nebenkriterien zeigen sich folgende signifikante Unterschiede zwischen Männern und Frauen:

Kardiale Rhabdomyome konnten bei männlichen Patienten signifikant häufiger gefunden werden als bei weiblichen Patienten. Unter den 145 Indexpatienten mit Rhabdomyomen sind 63,4% männlich und nur 36,6% weiblich. Wichtig ist hier aufgrund der Altersabhängigkeit von kardialen Rhabdomyomen, dass es keinen signifikanten Unterschied im medianen Alter zwischen Männern und Frauen gibt. Daher wurde zusätzlich das Geschlecht im Bezug auf CRM in der Gruppe der (-1)- bis Fünfjährigen untersucht, da hier der Altersgipfel von Rhabdomyomen liegt. In dieser Betrachtung zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen männlichen und weiblichen Patienten ( $p=0,219$ ). 51 von 123 Jungen zwischen -1 und fünf Jahren haben CRM (41,5%) und 37 von 110 Mädchen (33,6%) weisen Rhabdomyome auf. Von den 88 Kindern mit Rhabdomyomen sind also 42% weiblichen Geschlechts und 58% Jungen. Von den 13 Ungeborenen in der Gruppe -1 bis fünf Jahre haben 12 Feten den Nachweis von

CRM, also 92,3%. Dies führt zu einem hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Ungeborenen und postnatalen Patienten beiderlei Geschlechts (37,8% mit CRM).

Wie bereits durch zahlreiche Publikationen gezeigt, sind auch in diesem Kollektiv nur Frauen von einer pulmonalen LAM betroffen (23/23, 100%,  $p < 0,001$ ).

Für die restlichen klinischen Diagnosekriterien waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Männern und Frauen nachzuweisen.

### 3.4.2 SPORADISCH ENTSTANDENE MUTATION VERSUS FAMILIÄRES AUFTRETEN

Als nächsten Parameter der phänotypischen Ausprägungen wurde die Familiarität betrachtet. Im vorliegenden Patientenkollektiv trugen 497 Indexpatienten (70,0%) eine neu entstandene Mutation, wohingegen der TSC bei 97 Patienten (13,7%) vererbt wurde. Bei insgesamt 116 Indexpatienten (16,3%) konnte der Vererbungsmodus nicht geklärt werden. Das mediane Alter - zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Untersuchung - in der Gruppe mit de novo Mutation lag bei 8,00 Jahren (Durchschnittsalter 13,60 mit SD 14,747) in der Gruppe mit familiären Fällen bei 19,00 Jahren.

Tabelle 17 Sporadisch vs. familiär

	Sporadisch	Familiär
<b>TSC1/TSC2/NMI</b>	59/232/206	29/35/33
<b>Betroffen/V.a.</b>	311/186	67/29
<b>m/w/n</b>	256/230/11	47/49
<b>Medianes Alter</b>	8,00	19,00
<b>Durchschnittsalter(SD)</b>	13,60(14,747)	19,92(15,004)

Ob das *TSC1*- oder das *TSC2*-Gen von einer Mutation betroffen ist, korreliert mit der Vererbung ( $p < 0,01$ ). Bei den familiären Fällen treten in 45,3% *TSC1*-Mutationen und in 54,7% *TSC2*-Mutationen auf, es liegt eine Ratio von 0,8 vor. Die sporadischen Fälle hingegen zeigen eine Ratio von 1:4 (siehe Tabelle 17: *TSC1:TSC2* = 59:232  $\approx$  1:4). In der Gruppe der familiären Fälle ist der Anteil an *TSC1*-Mutationen also signifikant höher als bei sporadisch Erkrankten.

Bezüglich der klinischen Symptome zeigten sich im vorliegenden Kollektiv die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Die große Mehrzahl, nämlich 89%, der Indexpatienten mit kortikalen Tubera (TUB) haben eine de novo Mutation.

Bei den Patienten mit renalen AML weisen 102 von 113 (90,3%) eine sporadische Form des TSC auf. AML finden sich also in dieser Studienpopulation ebenfalls statistisch signifikant häufiger bei Patienten mit einer de novo Mutation.

Auch kardiale Rhabdomyome (CRM) scheinen statistisch signifikant häufiger bei Patienten mit leerer Familienanamnese aufzutreten. Von den 152 Indexpatienten mit CRM leiden 89,5% an einem sporadisch entstandenen TSC.

Alle 23 Indexfälle mit radiale Heterotopien der weißen Hirnsubstanz (CRML) sind de novo, kein einziger vererbt. Ein signifikanter Zusammenhang dieses klinischen Merkmals mit dem Vererbungsmodus scheint daher auch hier gegeben.

Das Auftreten von Nierenzysten (RC) ist hochsignifikant häufiger bei sporadischen Fällen zu beobachten. Von den 57 Fällen mit Nierenzysten sind 53, also 93%, sporadisch.

Einen Überblick über die errechneten p-Werte zeigt die folgende Tabelle 18.

Tabelle 18: Sporadisch vs. familiär, p-Werte

Hauptkriterien	p-Wert	Nebenkriterien	p-Wert
FA	0,555	CON	0,683
HM	0,315	CRML	0,031
SP	0,843	RC	0,045
UF	0,219	AP	0,365
TUB	0,008	GF	0,763
SEN	0,586	DEP	0,611
SEGA	0,894	RP	1,000
AML	0,035	HAM	1,000
RH	0,080	BC	1,000
CRM	0,025		
LAM	0,349		

### 3.4.3 ABHÄNGIGKEIT DES PHÄNOTYPS VOM BETROFFENEN GEN

Als zentrale Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt des jeweiligen mutierten Genes auf die Ausprägung des Phänotyps untersucht.

Eine gesicherte *TSC1*-Mutation hatten 89 Probanden (24,6%), eine nachgewiesene *TSC2*-Mutation 273 (75,4%) aller 362 Personen mit identifizierter Mutation. Das mediane Alter in beiden Gruppen unterscheidet sich stark. Die Patienten mit einer Mutation im *TSC1*-Gen sind im Median zum Zeitpunkt der genetischen Diagnostik 17,00 Jahre (Durchschnittsalter 18,38; SD 13,551) alt, die Patienten mit *TSC2*-Mutation mit 7,00 Jahren (Durchschnittsalter 12,75; SD 14,720) wesentlich jünger. Einen kurzen Überblick gibt Tabelle 19.

Tabelle 19 *TSC1* vs. *TSC2*

	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>
<b>TSC1/TSC2</b>	89/0	0/273
<b>Betroffen/V.a.</b>	68/21	209/64
<b>m/w/n</b>	42/47/0	152/114/7
<b>Medianes Alter</b>	17,00	7,00
<b>Durchschnittsalter(SD)</b>	18,38(13,551)	12,75(14,720)

Betrachtet man die Häufigkeit der klinischen Symptome in Abhängigkeit vom betroffenen Gen, so fallen die im Folgenden beschriebenen Auswertungsergebnisse auf.

Das Auftreten von renalen AML ist statistisch hochsignifikant vom betroffenen Gen abhängig. Nur 8 der 89 Patienten (9%) mit *TSC1*-Mutation haben renale AML, wohingegen 72 der 273 Untersuchten (26,4%) mit *TSC2*-Mutation AML aufweisen.

Die 26 beobachteten Fälle von retinalen Hamartomen finden sich ausschließlich beim Vorliegen einer *TSC2*-Mutation.

Bei nur 14 (15,7%) Patienten mit *TSC1*-Mutation finden sich kardiale Rhabdomyome, wohingegen es bei Patienten mit *TSC2*-Mutation 110 von 273 (40,3%) sind. Es besteht ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von CRM bei *TSC2*-Mutationen im Vergleich zu *TSC1*-Mutationen.

Des Weiteren zeigt sich eine statistisch signifikante Abhängigkeit des Auftretens renaler Zysten vom betroffenen Gen. Deutlich häufiger werden Nierenzysten beim Vorliegen von Mutationen im *TSC2*-Gen beobachtet: 36/39 (92,3%). Im Vergleich dazu sind es nur 3 von 39 Patienten (3,4%) mit Nierenzysten beim Vorliegen von *TSC1*-Mutationen.

Hamartome außerhalb der Niere finden sich in dem betrachteten Kollektiv ausschließlich bei *TSC2*-Mutationen (n=14).

Einen Überblick über die errechneten p-Werte beim Vergleich von *TSC1*-Mutationen zu *TSC2*-Mutationen in Bezug auf den Phänotyp gibt die folgende Tabelle.

**Tabelle 20 TSC1 vs. TSC2, p-Werte**

Hauptkriterien	p-Wert	Nebenkriterien	p-Wert
FA	0,717	CON	0,743
HM	0,142	CRML	0,743
SP	0,672	RC	0,009
UF	0,235	AP	1,000
TUB	0,457	GF	0,579
SEN	0,177	DEP	0,416
SEGA	0,081	RP	1,000
AML	0,001	HAM	0,026
RH	0,003	BC	1,000
CRM	<0,001		
LAM	0,462		

### 3.4.4 EFFEKTE DES MUTATIONSTYPS AUF DEN PHÄNOTYP

Die Art der Mutation beeinflusst bei vielen genetischen Erkrankungen den Schweregrad des Phänotyps. Um den Effekt des Mutationstyps auf die Ausprägung der einzelnen TSC-Symptome zu untersuchen, wurden die Mutationen in vier Gruppen eingeordnet, welche jeweils miteinander verglichen werden konnten (Translationale Stoppmutation = PT vs. Aminosäureaustausch = MS, sowie größere genomische Deletion = genom. Del. vs. Punktmutation = small Mut.): also einerseits Mutationen, die einen vorzeitigen Protein-Abbruch herbeiführen, hierzu zählen Nonsense-, Insertions-, Deletions-, Indel- und Spleiß-Mutationen; andererseits Mutationen, durch welche einzelne Aminosäuren ausgetauscht, deletiert oder eingefügt werden. Diese sind Missense-Mutationen, In-frame-Deletionen, bzw. – Insertionen.

Dazu kommt die Gruppe großer genomischer Deletionen gegen kleine Mutationen und Punktmutationen.

In der Gegenüberstellung PT versus MS im *TSC2*-Gen zeigten sich folgende Ergebnisse:

Es besteht eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Ausprägung der kortikalen Tubera und der Mutationsart. 17 der 159 Patienten mit Tubera (10,7%) haben eine Mutation aus der MS-Gruppe, bei den restlichen 142 Personen (89,3%) hingegen handelt es sich um eine Mutation aus der PT-Gruppe. Insgesamt zeigt sich jedoch bei den übrigen klinischen Merkmalen, betrachtet man nur das *TSC2*-Gen, kein signifikanter Unterschied zwischen PT und MS.

Vergleicht man im *TSC2*-Gen die großen Deletionen mit den kleinen Punktmutationen, so zeigt sich hier bei den meisten Merkmalen keine signifikante Abhängigkeit vom Mutationstyp. Jedoch scheint die Ausprägung von Angiomyolipomen von der Größe einer *TSC2*-Mutation beeinflusst zu sein. In der Gruppe der Patienten mit kleinen *TSC2*-Mutationen haben 24,0% von 250 Betroffenen renale AML. Bei den 23 Patienten mit einer großen *TSC2*-Deletion liegen hingegen bei 52,2% Angiomyolipome vor. Es zeigt sich ein hoher signifikanter Zusammenhang mit  $p=0,003$ .

Ähnlich verhält es sich mit Nierenzysten. Auch diese treten häufiger bei einem großen Rearrangement im *TSC2*-Gen auf als bei kleinen *TSC2*-Mutationen. 34,8% der 23 Patienten mit einer genomischen Deletion im *TSC2*-Gen zeigen renale Zystenbildung, aber nur 11,2% (28/250) derjenigen mit einer kleinen *TSC2*-Mutation ( $p=0,005$ ).

Auch extrarenale Hamartome (HAM) finden sich signifikant häufiger bei genomischen Deletionen als bei kleinen Gen-Defekten im *TSC2*-Gen (21,7% versus 3,6%;  $p=0,003$ ).

Zusätzlich wurde in Anlehnung an die Genotyp-Phänotyp-Studie von Au et al. [2] eine Gegenüberstellung der beiden Gruppen *TSC1*-PT versus *TSC2*-PT durchgeführt. Hierbei zeigt sich, dass einige Diagnosekriterien signifikant häufiger in der Gruppe *TSC2*-PT zu finden sind: 88% der Patienten mit SEGA haben eine translationale Stoppmutation in *TSC2*, nur 12% eine in *TSC1*. Ähnlich verhalten sich renale AML, retinale Hamartome, kardiale Rhabdomyome und Nierenzysten.



Tabelle 21 TSC2-PT versus MS und Small Mut. versus genom. Del., TSC1-PT vs.TSC2-PT, p-Werte

Diagnosekriterien	TSC2-PT vs. TSC2-MS p-Werte	TSC2-Small-Mut vs. TSC2-genom.Del. p-Werte	TSC1-PT vs.TSC2-PT
FA	0,204	0,146	0,551
HM	0,813	0,209	0,116
SP	0,165	0,752	0,858
UF	0,290	0,727	0,449
TUB	<0,001	0,958	0,087
SEN	0,091	0,907	0,098
SEGA	0,567	0,754	0,034
AML	0,095	0,003	0,001
RH	0,366	0,468	0,006
CRM	0,915	0,314	<0,001
LAM	0,357	0,170	0,258
CON	0,374	1,000	0,567
CRML	0,243	1,000	0,723
RC	0,104	0,005	0,016
AP	1,000	1,000	0,247
GF	0,044	0,366	0,134
DEP	0,309	0,366	0,801
RP	1,000	1,000	0,345
HAM	1,000	0,003	0,075
BC	1,000	1,000	0,345

### 3.4.5 PATIENTEN MIT IDENTIFIZIERTER MUTATION VERSUS OHNE NACHWEISBARE MUTATION

Um phänotypische Unterschiede zwischen Patienten, bei denen eine Mutation identifiziert werden konnte und denen ohne nachweisbare Mutation festzustellen, wurden die beiden Gruppen MI (Mutation identified) und NMI (No Mutation identified) betrachtet.

Das mediane Alter ist in beiden Gruppen annähernd gleich verteilt (MI 9,50 Jahre, NMI 10,00 Jahre).

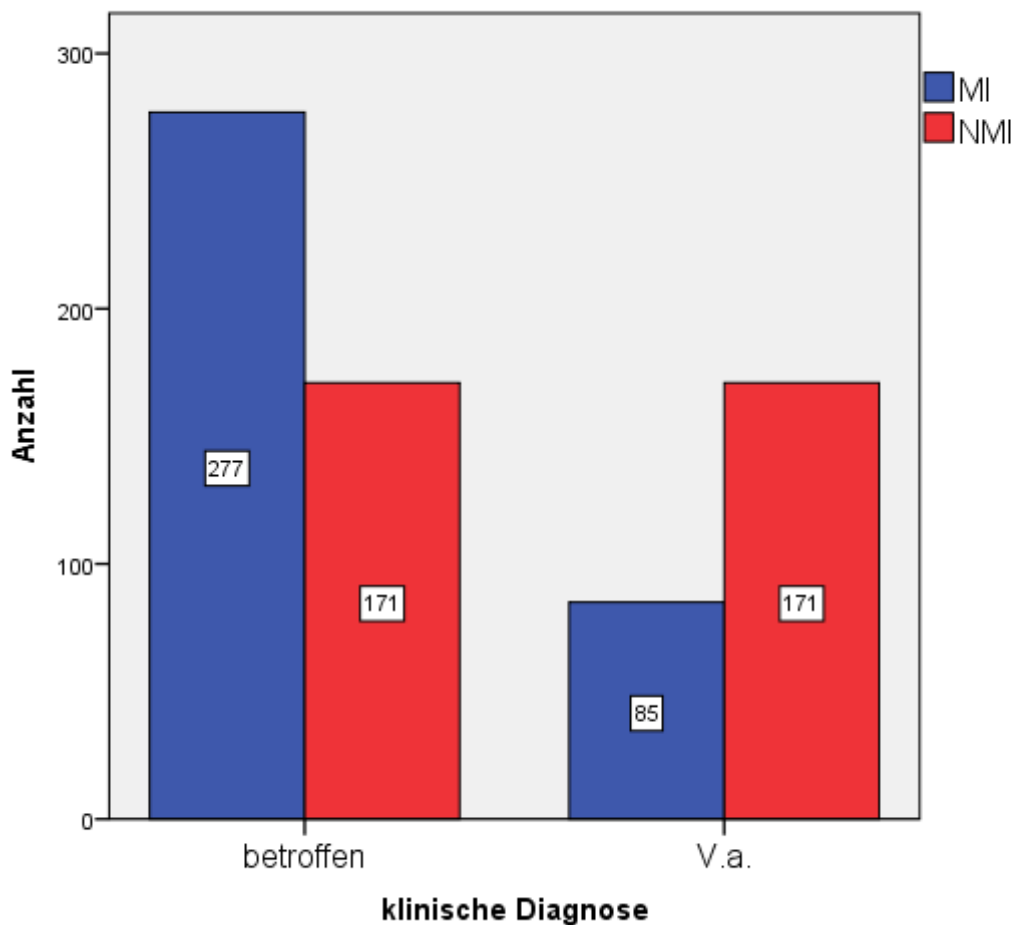
Tabelle 22 Überblick MI vs. NMI

	MI	NMI
TSC1/TSC2/NMI	89/273/0	0/0/348
Betroffen/V.a./fehl.	277/85	171/171/6
Info		
m/w/n	194/161/7	158/184/6
Medianes Alter	9,50	10,00
Durchschnittsalter(SD)	14,14(14,626)	15,45(15,715)

Betrachtet man den Einfluss der Sicherheit der klinischen Diagnose auf die Wahrscheinlichkeit, eine Mutationen zu identifizieren, so fällt Folgendes auf: bei 61,8% (277/448) der Patienten mit gesicherter klinischer Diagnose konnte eine Mutation gefunden werden, wohingegen es bei Patienten mit nur

wahrscheinlicher oder möglicher Diagnose in nur 33,2% (85/256) der Fälle gelang. Es besteht daher eine hochsignifikante Abhängigkeit zwischen der Sicherheit der klinischen Diagnose und dem Erfolg der Mutationssuche ( $p < 0,001$ ).

Abbildung 17 Zusammenhang klinische Diagnose und Mutationsnachweis



Der Großteil der klinischen Symptome, vor allem der sogenannten Hauptkriterien, findet sich signifikant häufiger bei Patienten, bei denen eine Mutation molekulargenetisch nachgewiesen werden konnte. Mit genauen Zahlen wird im Folgenden nur auf die Hauptkriterien eingegangen.

Von 180 Patienten mit fazialen Angiofibromen konnte bei 91,8%, eine Mutation identifiziert werden. Umgekehrt fanden sich bei den 362 Patienten mit nachgewiesener Mutation in 37,6% der Fälle faziale Angiofibrome.

Von den Ratsuchenden wiesen 260 hypomelantische Flecken auf, bei 68,8% (179/260) von ihnen konnte die klinische Diagnose mit dem Nachweis einer Mutation gesichert werden. Vice versa zeigten Patienten mit identifizierter Mutation zu 49,4% hypomelantische Flecken.

Bei 83,9% der Patienten mit Chagrin-Haut konnte eine Mutation detektiert werden.

Bei 75,9% der Patienten mit Nagelfalztumoren wurde eine Mutation identifiziert.

Bei 77,0% der Patienten mit Tubera gelang die molekulargenetische Sicherung der Diagnose mit dem Nachweis einer Mutation.

Bei 123 von 155 (79,4%) Patienten mit subependymalen Knoten konnte eine Mutation nachgewiesen werden. 33 Patienten mit SEGA (75,0%) haben eine nachgewiesene Mutation.

Bei 67,8% der Patienten mit AML wurde eine Mutation identifiziert. 22,1% der Patienten in der MI-Gruppe haben AML. Bei 26/35 Patienten (74,3%) mit retinalen Hamartomen (RH) wurde eine Mutation identifiziert. 7,2% der Patienten in der MI-Gruppe haben RH. 124/157 (79,0%) der Patienten mit kardialen Rhabdomyomen (CRM) haben eine molekulargenetisch nachgewiesene Mutation. 34,3% der Patienten in der MI-Gruppe haben CRM.

Es zeigt sich also - erwartungsgemäß - ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten klinischer Merkmale und der Wahrscheinlichkeit eines positiven Mutationsnachweises. Eine Mutation wird bei Patienten mit ausgeprägter Klinik somit wahrscheinlicher gefunden, als bei Patienten mit milder Symptomatik und dadurch nur wahrscheinlicher oder möglicher klinischer Diagnose.

**Tabelle 23 MI versus NMI, p-Werte**

<b>Hauptkriterien</b>	<b>p-Wert</b>
FA	<0,001
HM	<0,001
SP	<0,001
UF	<0,001
TUB	<0,001
SEN	<0,001
SEGA	0,001
AML	<0,001
RH	0,005
CRM	<0,001
LAM	0,464
CON	0,112
CRML	0,751
RC	0,010
AP	0,498
GF	0,001
DEP	0,012
RP	0,499
HAM	0,927
BC	0,681

## 4 DISKUSSION

### 4.1 KRITISCHE BETRACHTUNG DER METHODE

Zunächst sind grundsätzliche methodische Schwierigkeiten zu erwähnen. Da es sich um eine retrospektive Datenerhebung und -auswertung handelt, die anhand eines Fragebogens sowie ärztlicher Untersuchungsbefunde stattfand, waren oftmals keine oder nur ungenaue Befunde verfügbar. Dies führt in einigen betrachteten Untergruppen zu geringen Fallzahlen und damit zu Verlusten der statistischen Präzision.

Ein Vorteil dieser Datenakquirierung ist das wenig selektionierte Kollektiv. Sowohl in Bezug auf Alters-, als auch auf Geschlechtsverteilung ergibt sich eine repräsentative, homogen verteilte Stichprobe, deren Größe von insgesamt 1368 untersuchten Personen, davon 710 Indexpatienten, Voraussetzung für eine aussagekräftige Statistik ist.

Problematisch zeigt sich für die Genotyp-Phänotyp-Korrelation die Definition des Phänotyps, vor allem die Graduierung der Schwere der Erkrankung. Bisher fehlen in der einschlägigen Literatur exakte Angaben dazu, welche Symptome zu schwerer Erkrankung führen und welche Manifestationen ein mildes Erkrankungsbild ausmachen. Erschwert wird dies zudem, da bereits die meisten Symptome für sich genommen in zahlreichen Schweregraden vorkommen können (z.B. variierende Größe und Lage der Hamartome, mannigfaltige Epilepsieformen).

Für den Großteil der Betroffenen, wie auch in den meisten Publikationen, werden sehr häufig die neuropsychiatrischen Symptome als besonders schwerer Phänotyp eingeordnet, wenngleich sie nicht Bestandteil der veröffentlichten Diagnosekriterien sind [72]. Daher erweist sich das Fehlen ihrer standardisierten Erhebung im hier verwendeten Fragebogen als nachteilig. Eine zusätzliche Information über mentale Retardierung, Lernschwierigkeiten und Erkrankungen des autistischen Formenkreises, hätte die phänotypische Betrachtung um wichtige Parameter erweitert.

Zu bedenken ist auch, dass nicht sichergestellt werden kann, ob die Fragebögen wirklich korrekt ausgefüllt wurden und, ob die Patienten suffizient auf alle möglichen Symptome untersucht wurden (Betrachtung der Haut unter Wood-Lampe, Schnittbildgebung des Schädels, Bildgebung der abdominalen Organe, genaue Untersuchung der Finger- und Zehennägel). Hier könnten, aufgrund fehlerhafter Angaben, Fehlschätzungen auftreten, deren Ausmaß offen bleibt.

Bezüglich statistischer Probleme muss das Phänomen des multiplen Testens erwähnt werden. Für statistische Tests wird jeweils ein Signifikanzniveau (meist  $\alpha \leq 0,05$ ) festgelegt. Dieses begrenzt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des Fehlers erster Art, also das fälschliche Ablehnen der Nullhypothese, obwohl sie zutrifft. Nimmt die Zahl statistischer Tests innerhalb einer Stichprobe zu, so steigt auch die genannte Fehlerwahrscheinlichkeit. Exemplarisch heißt dies, dass schon bei 20 Tests innerhalb einer Stichprobe mit  $\alpha=0,05$  ein p-Wert nur zufälligerweise (falsch) positiv ( $\leq 0,05$ ) ist. Um diesem zu entgehen, müsste das Signifikanzniveau nach der Bonferroni-Methode ( $\alpha/k$ ,  $k$  = Anzahl der Tests) angeglichen werden. Dies würde aber zu sehr geringen, kaum realisierbaren Signifikanzniveaus weit unter 0,05 führen [4]. Erfreulicherweise erfüllen jedoch einige der hier vorliegenden Ergebnisse mit einem p-Wert  $< 0,001$  die geforderten Signifikanzniveaus nach Bonferroni. Trotzdem sollte für die vielen hier erbrachten Ergebnisse die geschilderte Möglichkeit falsch positiver Ergebnisse bedacht werden.

Eine weitere Herausforderung dieser Arbeit war die Charakterisierung der Pränataldiagnostik-Ergebnisse. Zum einen muss bedacht werden, dass bei den Feten keine Information über das Geschlecht besteht, daher werden die Feten als "Neutrum" (n) betrachtet. Hieraus resultiert jedoch, dass diese

Gruppe bei Korrelationen bezüglich des Geschlechts ausgeschlossen werden muss. Außerdem kann für die Ungeborenen keine sinnvolle Altersangabe (Alter zum Zeitpunkt der Diagnostik) gemacht werden, so dass hier ein Alter von -1 angenommen wird.

## 4.2 BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE

### 4.2.1 ALLGEMEINE ERGEBNISSE

Insgesamt liegt die Detektionsrate für Mutationen in diesem Kollektiv, unabhängig von der Sicherheit der klinischen Diagnose (klinisch gesichert versus TSC möglich oder wahrscheinlich), bei 51% und damit im Mittelfeld der bisher veröffentlichten Daten (21% bei Kozlowski et al. [49] bis hin zu 93% bei Sampson et al. [92], Cave: unterschiedliche Studiendesigns). Für die Patienten mit definitiver klinischer Diagnose anhand der Diagnosekriterien erhöht sich jedoch die Detektionsrate auf 61,8%. Dies spricht dafür, dass die Wahrscheinlichkeit eines positiven Mutationsnachweises mit dem Vorhandensein klinischer Diagnosekriterien deutlich ansteigt. Von den neun Patienten, bei denen klinisch ein Contiguous-Gene-Syndrom besteht, konnte eine entsprechende *TSC2/PKD1*-Deletion für acht Patienten nachgewiesen werden, was einer Detektionsrate von 88,9% entspricht.

Insgesamt ergibt sich eine Verteilung der Mutationen über *TSC1* und *TSC2* von 1:3 (*TSC1*:*TSC2*-Ratio). Gründe für diese Verteilung können zum einen sein, dass für *TSC1* kaum Missense-Mutationen und genomische Rearrangements bekannt sind, zum anderen, dass die kodierende Region von *TSC2* deutlich größer ist und fast doppelt so viele Exons wie *TSC1* enthält [54], S. 44.

Die Verteilung der Mutationstypen sowohl in *TSC1* ( 41,6% Nonsense, 40,5% Frameshift, 13,5% Spleiß, 3,4% Missense), als auch in *TSC2* (29,7% Frameshift, 20,9% Nonsense, 19,8% Spleiß, 19,4% Missense, 8,4% genomische Deletionen, 1,5% In-Frame) deckt sich im Wesentlichen mit der bisherigen Lehrmeinung (vgl. Kapitel 1.1.3.4, [54], S. 37).

Bei 11,3 % (80 Patienten) der Indexpatienten sind unklassifizierte Varianten nachgewiesen, also DNA-Veränderungen, deren Pathogenität bisher nicht geklärt werden konnte, wobei 47 dieser Patienten zusätzlich eine andere, sicher pathogene Mutation aufweisen. Dennoch ist zu beachten, dass die Varianten eventuell krankheitsverursachend sein könnten. Daher ist es besonders wichtig, den Kontakt zu diesen Patienten aufrecht zu erhalten und bei Verfügbarkeit neuer funktioneller Testungen von Varianten erneut eine Untersuchung auf Pathogenität anzubieten.

### 4.2.2 AUSWERTUNG DER VERWENDETEN METHODEN

Insgesamt stellt sich eine Diskussion der Methoden insofern erschwert dar, als ihr Erfolg zu einem Großteil davon abhängt, wie gut sie im entsprechenden Labor etabliert sind. Daraus können sich somit große Unterschiede zwischen verschiedenen Kollektiven (in der Literatur und unserem) ergeben. Außerdem ist die Angabe einer spezifischen „Erfolgsrate“ einer jeweiligen Methode kaum möglich, da viele Verfahren aufeinander aufbauen.

In den hier vorgestellten Ergebnissen spiegelt sich vor allem wider, dass bisher die Sanger-Sequenzierung den Goldstandard zur Detektion von Mutationen darstellt. Im vorliegenden Kollektiv wurde die Mutation bei drei Viertel (74,3%) der MI-Patienten durch Sanger-Sequenzierung detektiert.

An zweiter Stelle bezüglich der erfolgreichen Mutationssuche steht die Kombination aus Screeningmethode und nachfolgender Sequenzierung (17,4%), wobei der PTT ( 9,9 %) erfolgreicher ist als DHPLC (6,2%). Allerdings ist dieser Vergleich in der vorliegenden Arbeit nur für *TSC2*-Mutationen möglich, da nur bei diesen DHPLC angewandt wurde. Vorteile von DHPLC sind die hohe Spezifität und Sensitivität [11, 86]. Der PTT zeichnet sich vor allem durch die Möglichkeit aus, mehrere Exons gleichzeitig zu untersuchen [61].

Für das Aufspüren großer Rearrangements bietet die MLPA eine Analyse der gesamten codierenden Regionen beider *TSC*-Gene [94]. Vermutlich liegt es daran, dass der Hauptanteil der großen Deletionen des hier untersuchten Kollektivs mittels MLPA nachgewiesen wurde.

Seit 2012 konnte mit der neuen und zukunftsweisenden Methode des NGS bei sechs Patienten, die zuvor zur Gruppe NMI gehörten, eine Mutation nachgewiesen werden. Der Vorteil der NGS-Methoden ist, dass auch kleine Mengen an mutationstragender DNA, wie dies zum Beispiel bei Mosaiken der Fall ist, entdeckt werden können. Man verspricht sich daher für die Zukunft vor allem Erfolge in der Detektion von Mosaiken und heterozygoten Mutationen in regulatorischen Regionen, die bisher durch konventionelle Verfahren nicht entdeckt wurden [79].

#### 4.2.3 EINFLUSS DES GESCHLECHTS AUF DEN KLINISCHEN PHÄNOTYP

Beim Vergleich von Männern und Frauen im Bezug auf die klinischen Diagnosekriterien zeigen sich kaum signifikante Unterschiede. Wie bereits mehrfach gezeigt [85, 95], hängt das Auftreten der pulmonalen Lymphangioliomyomatose auch in dem hier vorliegenden Kollektiv entscheidend vom Geschlecht ab. Unter den Indexpatienten findet sich kein männlicher Patient mit LAM.

Ferner unterliegen in der untersuchten Population auch die kardialen Rhabdomyome einer Geschlechtsabhängigkeit. Es finden sich signifikant mehr männliche Patienten mit kardialen Rhabdomyomen. Für alle übrigen Kriterien besteht kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Patienten.

Letzteres Ergebnis unterscheidet sich deutlich von bisherigen Studien [2, 93]. Bei Au et al. [2] leiden Männer signifikant häufiger an neurologischen Symptomen (Tubera, subependymale Gliaknoten, mentale Retardierung, Epilepsie). Sancak et al. [93] berichten signifikant häufigeres Auftreten von mentaler Retardierung, Nierenzysten, Retina-Hamartomen, fazialen Angiofibromen, Zahnfleisch- und Nagelfalzfibromen bei Männern. Auch untereinander unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Studien.

Im Kollektiv dieser Arbeit sind unter anderem faziale Angiofibrome, Tubera, subependymale Gliaknoten und Riesenzellastrozytome etwas häufiger bei Männern zu beobachten, Angiomyolipome häufiger bei Frauen (siehe Tabelle). Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Trotzdem könnte hier ein Einfluss der Sexualhormone vorliegen wie auch bei LAM (siehe Kapitel 1.1.2.6).

Ein Problem der vorliegenden Arbeit ist, dass die Parameter mentale Retardierung und Epilepsie nicht standardisiert erhoben werden konnten und somit auch nicht ausgewertet wurden. Daher können diesbezüglich keine Aussagen über eventuelle Übereinstimmungen mit Au et al. und Sancak et al. getroffen werden.

Für die pulmonale LAM kann, unterstützt durch die vorliegenden Ergebnisse, auch weiterhin von einer deutlichen Geschlechtsabhängigkeit ausgegangen werden. Nach bisherigen Untersuchungen beruht diese zu einem Großteil auf dem Einfluss der Geschlechtshormone, die über die Modulation der Rheb/mTOR-Kaskade auf das Zell-Verhalten in den *TSC*-Läsionen einwirken [53, 112].

Eine schlüssige Erklärung, warum im hier vorliegenden Kollektiv signifikant mehr männliche Patienten an Rhabdomyomen leiden, bietet sich in der aktuellen Literatur nicht, möglicherweise aufgrund geringer Fallzahlen in Studien zu diesem Merkmal. Es bleibt Spekulation, ob auch hier eine hormonelle Ursache besteht (Änderung der endokrinen Homöostase - "Spontan-Regression").

Die ausgeprägte Altersabhängigkeit der kardialen Rhabdomyome zeigt im vorliegenden Kollektiv keine Geschlechtsunterschiede. Zur Verifizierung wurde das Merkmal zusätzlich nur in der Gruppe der Ungeborenen bis Fünfjährigen untersucht. Hier zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ( $p=0,219$ ). Von 123 Jungen und 110 Mädchen im Alter von -1 bis fünf haben 41,5% Jungen und 33,6% Mädchen Rhabdomyome. Daher könnte das oben genannte Ergebnis, dass Rhabdomyome öfter bei Männern auftreten, auch ein Zufallsergebnis sein.

Zieht man in die Betrachtung die Ungeborenen der Pränataldiagnostik mit unbekanntem Geschlecht hinzu, zeigt sich erwartungsgemäß eine hohe Signifikanz ( $p < 0,001$ ). Zwölf der dreizehn Ungeborenen präsentieren Rhabdomyome (92,3%). Somit bestätigt sich die vielfach gemachte Beobachtung, dass kardiale Rhabdomyome eines der ersten Zeichen eines TSC sind [72].

**Tabelle 24 nicht signifikante Unterschiede von Diagnosekriterien m vs.w**

Kriterium	Anzahl an Männern (Prozent)	Anzahl an Frauen (Prozent)
FA	97/180 (53%)	83/180 (46%)
TUB	122/222 (55%)	100/222 (45%)
SEN	81/155 (52,3%)	74/155 (47,7%)
SEGA	23/44 (52,3%)	21/44 (47,7%)
AML	53/118 (44,9%)	65/118 (55,1%)

#### 4.2.4 ZUSAMMENHANG DES STAMMBAUMS (FAMILIÄR VS. SPORADISCH) AUF DEN PHÄNOTYP

Wie in Kapitel 3.4.2 bereits aufgezeigt, ist im vorliegenden Kollektiv bei 70% der Indexpatienten TSC sporadisch, während bei fast 14% TSC familiär aufgetreten ist (von 16,3% gab es keine Information bezüglich familiärer Belastung).

Auffällig ist, dass sich das mediane Alter der beiden Gruppen deutlich unterscheidet. Die Patienten mit de novo entstandener Mutationen sind mit einem Median von 8 Jahren zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Untersuchung deutlich jünger, als die Untersuchten in der familiären Gruppe (medianes Alter 19 Jahre). Diese Beobachtung könnte die Annahme stützen, dass familiäre Fälle meist einen milderen Phänotyp ausprägen. Solche Patienten könnten entweder erst später klinische Manifestationen zeigen, möglich ist auch, dass sie durch den milderen Phänotyp weitgehend unbeeinträchtigt aufwachsen und erst im Zuge eines eigenen Kinderwunsches eine Mutationsuche durchführen lassen.

Wichtig ist, dass dieser signifikante Altersunterschied der beiden Gruppen im Bezug auf die Betrachtung der einzelnen klinischen Merkmale einen statistischen Beobachtungs-Fehler bedingen kann, da einige der klinischen Symptome altersabhängig sind.

Innerhalb der familiären Fälle lässt sich eine *TSC1:TSC2* Ratio von 1:1 beobachten, wohingegen sie in den sporadischen Fällen bei 1:4 liegt. Zu einem fast identischen Ergebnis kommt auch die Studie von Au et al. [2]. Auch dieser Befund ist vereinbar mit der Hypothese des mildereren Phänotyps bei betroffenen Familien, da höhere Morbidität und Mortalität mit verminderter Fertilität und Weitergabe einhergehen. Zudem sind strukturelle Unterschiede der beiden TSC-Gene zu bedenken; hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Betrachtet man die signifikanten Ergebnisse der Korrelation "familiär versus sporadisch" im Bezug auf die klinischen Diagnosekriterien, deckt sich dies ebenfalls mit der Annahme, dass sporadische Fälle meist schwerer verlaufen. So waren Tubera der Hirnrinde und radiale Heterotopien signifikant häufiger bei Patienten mit sporadischem TSC nachzuweisen. Bedenkt man, dass zentralnervöse Atypien mit vermehrter Anfallshäufigkeit und mentaler Retardierung einhergehen können [48], ist auch funktionell von einem schwereren Phänotyp auszugehen.

Ähnliches gilt auch für die Nierenbeteiligung. Im untersuchten Kollektiv sind renale AML und Nierenzysten signifikant häufiger bei sporadischer Erkrankung und steigern dort Morbidität und Mortalität [80].

Dass auch kardiale Rhabdomyome bei sporadischen Fällen häufiger zu sein scheinen, muss vorsichtiger kommentiert werden: dieses Symptom ist sicherlich sehr stark vom Alter des Patienten abhängig und wird fast ausschließlich bei Neugeborenen, pränatal oder in der Säuglingsperiode beschrieben [72]. Bedenkt man den deutlichen Altersunterschied der beiden zu vergleichenden Gruppen (sporadische Fälle deutlich jünger), ist hier von einem Selektionseffekt auszugehen, da bei sehr früher extrakardialer Manifestation die Echokardiographie gehäuft zum Einsatz kommt.

#### 4.2.5 EFFEKT DES MUTIERTEN GENS AUF DEN PHÄNOTYP

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt besteht ein deutlicher Altersunterschied zwischen den beiden Gruppen *TSC1* und *TSC2*. Der Altersmedian bei *TSC1*-Mutation beträgt 17 Jahre, bei *TSC2*-Mutation 7 Jahre. Diese Beobachtung kann die Annahme, dass *TSC1*-Mutationen einen mildereren Phänotyp hervorrufen, unterstützen. Wegen geringfügiger Symptome stellt sich diagnostischer Bedarf erst in späterem Alter. Gleichzeitig sind auch hier (siehe Kapitel 4.2.2) möglicherweise Selektionsfaktoren innerhalb unserer Stichprobe am Werk.

Im untersuchten Kollektiv haben 75,4% eine *TSC2*-Mutation. Ein ähnliches Verhältnis (1:4 *TSC1:TSC2*) findet sich bei Au et al. [2]. Eine mögliche Ursache für die geringere Mutationshäufigkeit von *TSC1* könnte die geringere Größe mit kleinerer kodierender Region und weniger Exons sein [2, 19, 93]. Oder auch eine höhere Dunkelziffer an nicht erkannten Fällen, hervorgerufen durch den mildereren Phänotyp.

Eine Nierenbeteiligung in Form von AML und Zysten ist signifikant häufiger bei *TSC2*-Patienten dokumentiert. Ebenso zeigt sich dies für extrarenale Hamartome einschließlich derer der Retina (vgl. Kapitel 3.4.3). Dies stützt die Theorie von Yeung et al. [111], dass insbesondere Tuberin innerhalb des Tuberin-Hamartin-Komplexes eine gesonderte Rolle in der Zellregulation von Nierengewebe spielen könnte. Da eine renale Beteiligung mit hohem Krankheitswert und damit eingeschränkter Lebensqualität einhergeht (eingeschränkte Nierenfunktion, Blutungskomplikationen [80]), ist hier von einem belastenderen Phänotyp auszugehen.

Demgegenüber fällt auf, dass sowohl zentralnervöse Symptome wie Tubera oder SEGAs wie auch Hautmanifestationen ohne signifikanten Unterschied zwischen *TSC1* und *TSC2* auftreten.



Nach den statistischen Ergebnissen scheinen kardiale Rhabdomyome signifikant häufiger bei *TSC2*-Patienten vorzukommen. Jedoch kann dieser Befund durch eine falsch niedrige Rate bei den *TSC1*-Patienten (seltener Echokardiographie beim jungen Säugling wegen milden Phänotyps) verzerrt sein (siehe Kapitel 4.2.2).

#### 4.2.6 EINFLUSS DES MUTATIONSTYPUS AUF DEN PHÄNOTYP

Zwischen PT- und MS-Mutation im *TSC2*-Gen zeigen sich kaum relevante Unterschiede. Lediglich Tubera scheinen häufiger (89,3%) bei vorzeitigem Proteinabbruch (PT) im *TSC2*-Gen aufzutreten. Bezüglich der übrigen Diagnosekriterien bestehen keine signifikanten Unterschiede. Ein Aminosäure-Austausch ohne Leserasterverschiebungen (MS) in *TSC2* scheint daher etwa die gleiche Auswirkung auf den Phänotyp zu haben wie translationale Stoppmutationen. Zu einem ähnlichen Schluss kommt auch die Genotyp-Phänotyp-Studie von Au et al. [2]. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass der Funktion von Tuberin im Heterodimer eine derart tragende Rolle zukommt im Vergleich zu Hamartin, dass sie bereits durch einzelne Aminosäureaustausche (hervorgerufen durch MS-Mutationen) schwerwiegend gestört wird.

Van Eeghen et al. konnten diesbezüglich nachweisen, dass Mutationen in den Tuberin-Hamartin-Interaktionsdomänen beider Gene zu deutlich niedrigeren Intelligenzquotienten mit retardierter kognitiver Entwicklung führen [101]. Somit wird die Wichtigkeit einer funktionierenden Interaktion von Tuberin und Hamartin deutlich.

Vergleicht man für *TSC2* große Deletionen mit kleinen Punktmutationen, fällt auf, dass eine Nierenbeteiligung signifikant häufiger bei großen Deletionen zu finden ist. Über die Hälfte der Patienten mit einer großen Deletion weisen renale AML auf. 34,8% der Patienten zudem Nierenzysten, wobei zu erwähnen ist, dass bei circa einem Drittel der Patienten mit genomischer Deletion ein *TSC2/PKD1*-Syndrom vorliegt. Dadurch lässt sich die Häufung von Nierenmanifestationen bei genomischen Deletionen von *TSC2* erklären.

In *TSC1* wurde im untersuchten Kollektiv nur eine einzige genomische Deletion gefunden (c.(?\_15723)\_(-6119\_?)del, Exon 1 bis Exon 2). Dieser Patient leidet an fazialen Angiofibromen, hypomelanotischen Flecken und Tubera. In der Literatur wird die Wahrscheinlichkeit von großen Deletionen in *TSC1* mit 0,5% als niedrig angegeben [49]. Zwei in der Literatur berichtete Fälle weisen ein ähnliches phänotypisches Profil auf wie der hier untersuchte Patient: faziale Angiofibrome (2), Chagrin-Haut(2), Tubera (2), Nagelfalztumore (1), hypomelanotische Flecken (1) und Konfettiflecken (1) [54, 68]. Es wird deutlich, dass in allen drei Fällen eine Beteiligung der Haut vorherrscht, wohingegen eine Beteiligung der Nieren fehlt. Dies unterstreicht die Bedeutung der großen *TSC2*-Deletionen für die Niere im Gegensatz zu *TSC1*.

Der Vergleich von PT-Mutationen in *TSC1* versus *TSC2* zeigt auf, dass SEGAs, renale AML, Nierenzysten, retinale Hamartome und kardiale Rhabdomyome signifikant häufiger bei translationalen Stoppmutationen im *TSC2*-Gen vorkommen. Ein ähnliches Ergebnis zeigt die Studie von Au et al. (PT-*TSC2*: häufiger subependymale Knoten, AML, Nierenzysten, hypomelanotische Flecken, faziale Angiofibrome) [2]. Diese Beobachtung lässt somit vermuten, dass ein vorzeitiger Proteinabbruch von Tuberin zu einem stärkeren Verlust der Tumor-Suppressor-Funktion führt als bei Hamartin. Insgesamt unterstreicht sie damit die Hypothese aus 3.4.3, dass *TSC2* mit einem schwerwiegenderen Phänotyp einhergeht.

#### 4.2.7 PHÄNOTYPISCHE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN PATIENTEN MIT UND OHNE IDENTIFIZIERTE MUTATION SOWIE ÜBERLEGUNGEN ZUR URSACHE VON "NMI"

Insgesamt zeigt sich ein sehr deutlicher Unterschied in der Ausprägung des Phänotyps beim Vergleich der Patienten mit nachgewiesener Mutation (MI) und derjenigen ohne eine solche (NMI). Bei der zunächst durchgeführten Gegenüberstellung fällt auf, dass fast alle klinischen Kriterien, insbesondere Haut-, ZNS- und Nierenmanifestationen, signifikant häufiger bei Patienten mit positivem Mutationsnachweis (*TSC1* und *TSC2*) zu finden sind. Die Patienten, bei denen keine Mutation nachgewiesen werden kann, haben somit einen vielfach milderen Phänotyp.

Hieraus ergibt sich, dass bei ausgeprägtem Phänotyp und damit gesicherter klinischer Diagnose die Wahrscheinlichkeit einer positiven Mutationssuche deutlich höher ist. Dieses Erkenntnis kann bei der Beratung von klinisch auffälligen Ratsuchenden vor einer molekulargenetischen Testung zur Einschätzung der Erfolgswahrscheinlichkeit dienen.

Zur weiteren Einschätzung von Phänotyp-Unterschieden wurden die Vergleiche NMI versus positiven *TSC1*-Befund und NMI versus positiven *TSC2*-Befund angestellt. In einigen bisher veröffentlichten Studien ([19], [93], [2], [10]) wurde die Beobachtung gemacht, dass die Gruppe der NMI in Gegenüberstellung zu *TSC2*-Mutations-Trägern einen milderen Phänotyp ausbilden, jedoch im Vergleich zu *TSC1*-Mutations-Trägern einen ähnlich schweren oder sogar etwas schwerwiegenderen Phänotyp präsentieren.

Im hier vorliegenden Kollektiv ergaben sich ähnliche Beobachtungen, zumindest im Bezug auf den Vergleich von NMI und *TSC2*. Der Großteil der Haupt- und Nebenkriterien (faziale Angiofibrome, hypomelanotische Flecken, Chagrin Haut, Nagelfalzfibrome, Gingiva-Fibrome, Zahnschmelzdefekte, Tubera, subependymale Gliaknoten, SEGA, AML, Nierenzysten, Netzhauthamartome, kardiale Rhabdomyome) findet sich in dieser Betrachtung hoch signifikant häufiger bei Personen mit *TSC2*-Mutation im Gegensatz zu Personen ohne identifizierte Mutation und bestätigen diesbezüglich die Voruntersuchungen.

Bei den Auswertungen bezüglich NMI versus *TSC1* im hier untersuchten Kollektiv ergaben sich kaum signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Haupt- und Nebenkriterien. Die Hautmanifestationen Angiofibrome, hypomelanotische Flecken und Chagrin-Haut sowie die ZNS-Symptome Tubera und Gliaknoten treten bei Patienten mit *TSC1*-Mutation öfter auf als bei NMI-Patienten. Somit bestätigt sich zwar nicht die Beobachtung von Au et al. [2], dass NMI-Fälle schwerer betroffen sind als *TSC1*-Patienten, es ergibt sich daraus jedoch zumindest, dass der NMI-Phänotyp dem bei nachgewiesener *TSC1*-Mutation ähnlich ist. Übereinstimmende Ergebnisse liefert hierzu die Studie von Dabora et al. [19].

Natürlich muss berücksichtigt werden, dass eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen NMI und MI nicht möglich ist, da der Genotyp von NMI ja nicht bekannt und höchstwahrscheinlich sehr heterogen ist. Es ist jedoch möglich aufgrund dieser Ergebnisse Spekulationen über den Genotyp von NMI anzustellen.

So legt die Beobachtung, dass der Phänotyp der NMI-Fälle mehr dem der *TSC2*-Mutationen als der *TSC1*-Fälle gleicht, die Möglichkeit nahe, dass auch bei diesen Patienten *TSC2* mutiert sein könnte. Eventuell befindet sich die Mutation in nicht kodierenden Regionen von *TSC2* oder *TSC1*, was mit Routine-Methoden nicht identifiziert werden konnte.

Ferner könnten Mosaik die Identifizierung einer Mutation verhindern. Diese entziehen sich aufgrund ihres geringen Anteils sehr häufig den gängigen Nachweisverfahren. Auch der etwas mildere Phänotyp

kann durch Mosaik erklärt werden, da meist nicht alle Gewebe bzw. Organe des Organismus eine postzygotische Mutation tragen. Somatische Mosaik als Erklärung erscheinen sehr wahrscheinlich, sie sind bisher bei TSC gut beschrieben und zeigen bis zu 26% große Deletionen [92].

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für NMI wäre das Vorhandensein eines dritten, bisher unentdeckten, TSC-Genes. Ein sicherer Hinweis hierauf fehlt jedoch aktuell. Auch die mTOR-Signalkaskade, die durch den Hamartin-Tuberin-Komplex reguliert wird, gibt keinen Hinweis auf die Beteiligung eines dritten TSC-Produktes [10].

Ebenfalls können unzureichende Detektionsmethoden für das Übersehen von Mutationen verantwortlich sein. Hierbei könnten vor allem Mutationen, welche die Transkription oder die posttranskriptionelle Modifikation von *TSC1*- oder *TSC2*-mRNAs betreffen und in Regionen außerhalb der codierenden Exons liegen, durch die Raster der gängigen Testverfahren fallen, da der Großteil der molekulargenetischen Tests auf Exons fokussiert ist. Ähnliches trifft für Intronmutationen innerhalb des *TSC1*- oder *TSC2*-Gens zu [62, 78].

### 4.3 KONSEQUENZEN UND AUSBLICK

Auch weiterhin kommt der genauen Lokalisation und Identifikation jeder einzelnen Mutation für sich genommen, aufgrund der hohen klinischen Variabilität, selbst bei Patienten mit identischen TSC-Mutationen, nur eine geringe prädiktive Aussagekraft zu. Dennoch belegen die hier aufgezeigten Ergebnisse die folgenden Hypothesen aus vorangegangenen Studien und bekräftigen diese somit um so mehr.

Auch für die Zukunft gelten die Annahmen, dass *TSC1* meist milder verläuft als *TSC2* und dass neu entstandene Mutationen oft zu einem schwerer verlaufenden Krankheitsbild führen. Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese von *TSC2* führen, scheinen insgesamt zu schwerwiegenderen Symptomen zu führen. Missense-Mutationen in *TSC2* hingegen, gehen mit einem ähnlichen Phänotyp wie Stopp-Mutationen in *TSC1* einher. Das phänotypisch gegenüber Mutationen „resistentere“ *TSC1*-Gen würde erst durch schwerer wiegende Veränderungen ein ähnliches klinisches Bild hervorrufen, wie es *TSC2* bereits bei „leichteren“ Mutationen tut.

Auch der Zusammenhang einer Nierenbeteiligung mit einer Mutation im *TSC2*-Gen hat sich in diesem Kollektiv erneut bestätigt, ebenso wie die Abhängigkeit gewisser Symptome, vor allem der LAM und AML, vom (weiblichen) Geschlecht. Hier sind weitere Studien, die den Einfluss der Sexualhormone auf die Rheb/mTOR-abhängige Zellzyklus-Steuerung untersuchen von großem Interesse, auch im Hinblick auf pharmakologische Therapieoptionen. Die Beobachtung am hier untersuchten Kollektiv, dass Rhabdomyome, gemessen am gesamten Indexkollektiv, häufiger bei männlichen Patienten auftreten, bedarf sicherlich in Zukunft erneuter Überprüfung, zumal sie hier erstmalig gemacht wurde.

Die hier analysierten Ergebnisse bestätigen, dass TSC-Patienten ohne identifizierbare Mutation einen vergleichsweise milderen Phänotyp aufweisen. Im Umkehrschluss bedeutet dies jedoch auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen positiven Mutationsnachweis bei ausgeprägtem Phänotyp, beziehungsweise bei gesicherter klinischer Diagnose.

Ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wäre sicherlich das Follow-up pränatal untersuchter Fälle (sofern nicht aufgrund des positiven Mutationsnachweises ein Schwangerschaftsabbruch stattgefunden hat). In diesen Fällen könnte man von Beginn an Manifestationsalter und Qualität der einzelnen Symptome präzise dokumentieren. Es ist zu erwarten, dass Unterschiede im Manifestationsalter als Ausdruck unterschiedlichen Schweregrades mit einzelnen

Mutationstypen korrelieren. Es wäre auch sinnvoll, die Wirkung der pubertären hormonellen Dynamik zu untersuchen. Zu bedenken ist hierbei jedoch sicherlich, dass nur geringe Fallzahlen zustande kommen würden.

Um weitere Genotyp-Phänotyp-Korrelationen herzustellen, wäre in Zukunft ein prospektives, zentralisiertes Studiendesign vorteilhaft, vielleicht koordiniert durch die deutschlandweiten TSC-Zentren. Von Nutzen wäre vor allem eine standardisierte körperliche Untersuchung auf alle potentiellen Symptome durch spezialisierte Ärzte, sowie die Erfassung der neurokognitiven Probleme. Hierdurch könnten fehlerhafte und vor allem lückenhafte Angaben vermieden werden. Dazu wurde bereits die TOSCA-Datenbank (Tuberous Sclerosis Registry to Increase Disease Awareness), ein europa-beziehungsweise weltweites Patientenregister, gegründet. Die durch TSC-Zentren standardisiert erhobenen Daten werden an diese Datenbank weitergegeben und dort archiviert [46].

Der Einsatz von NGS könnte außerdem eine deutlich höhere Detektionsrate erreichen und dadurch Aussagen über den Genotyp bisheriger NMI-Patienten ermöglichen.

Aktuell zeigen sich allerdings anhand der hier mitgeteilten Ergebnisse keine Hinweise darauf, dass eine exakte Genotyp-Phänotyp-Korrelation bezogen auf einzelne Mutationen besteht. Daher dient die Mutationsidentifikation auch weiterhin einer orientierenden Beratung der betroffenen Familien bezüglich Krankheitsverlauf, Therapieoptionen und Familienplanung. Die Entscheidungen über Therapie und Vorsorgekonzepte müssen auch in Zukunft auf der Grundlage des individuellen Phänotyps und der persönlichen Umstände und nicht nur eines Genotyps getroffen werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Der TSC ist eine genetische Erkrankung, hervorgerufen durch Mutationen entweder im *TSC1*-oder *TSC2*-Gen auf den Chromosomen 9q34 und 16p13.3, der einem autosomal dominanten Erbgang mit vollständiger Penetranz folgt. Klinisch zeigt die Tuberöse Sklerose ein vielfältiges Krankheitsbild mit einer breiten Streuung ihres Schweregrades.

Unter allen Lebendgeburten kommt sie mit einer Häufigkeit von 1/6000 bis 1/10000 vor, circa 75% der Fälle sind sporadische Neumutationen [67].

Es können Symptome in jedem Organ auftreten, vorwiegend jedoch im ZNS, der Haut und ihren Anhangsgebilden, den Nieren, Augen und auch in Herz und Lunge sowie an den Zähnen und am Zahnfleisch.

Bei den Genen *TSC1* und 2 handelt es sich um sogenannte Tumor-Suppressor-Gene, die Zellzyklus und -wachstum regulieren. Dies geschieht über ihre Genprodukte Tuberin und Hamartin, die ein funktionelles Heterodimer bilden [15, 75]. Der Hamartin-Tuberin-Komplex führt zur Inaktivierung von mTOR, wodurch ein Zellzyklusarrest herbeigeführt wird. Durch eine Mutation kommt es zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit zur Ausbildung der für den TSC pathognomonischen Hamartome. Die Pathogenese kann entsprechend der "Zweitreffertheorie" nach Knudson erklärt werden: eine erste (heterozygote) Mutation in einer elterlichen Keimzelle und ein zweiter "Treffer" in Form einer somatischen Mutation auf dem homologen Gen, wodurch es zum LOH kommen kann [47], d.h. zur Nullisomie des Wildtyp-Allels.

Das Mutationsspektrum weist alle gängigen Typen auf, wobei Deletionen und Nonsense-Mutationen im *TSC1* die häufigsten Arten sind und Missense-Mutationen gefolgt von Deletionen und Nonsense-Mutationen die führenden im *TSC2* sind.

In 75 bis 90% der Fälle gelingt der molekulargenetische Nachweis der krankheitsverursachenden Mutation [72]. Die Mutationssuche verläuft dabei meist in mehreren Stufen. Auch über einige der klinischen Manifestationen, die durch ihre besondere Spezifität als Diagnosekriterien dienen, kann das Vorliegen der TS diagnostiziert werden [72, 83].

Zur Prädiktion des Krankheitsverlaufes ist eine Korrelation von Genotyp und Phänotyp sinnvoll und wünschenswert. Gerade dies gestaltet sich jedoch beim TSC aufgrund der enormen klinischen Variationsbreite schwierig. Einige allgemeine Zusammenhänge konnten allerdings in den letzten Jahren hergestellt werden. So zeigt sich aktuell, dass *TSC1* mit mildereren Krankheitsverläufen einhergeht, ebenso wie Fälle ohne nachweisbare Mutation (NMI) und auch familiäre Fälle [2, 93].

Ziel dieser Arbeit war es, die in vorangegangenen Studien aufgezeigten Zusammenhänge von Gen, Mutationsart und klinischem Verlauf (Genotyp-Phänotyp-Korrelation) an einer großen Fallzahl zu überprüfen und noch differenzierter herauszuarbeiten. Es wurden Unterschiede bezüglich *TSC1* versus *TSC2* betrachtet, die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationsarten auf den Phänotyp, die Rolle des Geschlechts sowie familiäres versus sporadisches Auftreten. Zudem wurden Unterschiede zwischen Patienten mit nachgewiesener Mutation und ohne Mutationsnachweis untersucht.

Das betrachtete Patientenkollektiv besteht insgesamt aus 1368 Patienten (633 männlich, 677 weiblich, 58 Geschlecht unbekannt), wobei in die statistische Auswertung nur die Indexpatienten (710) eingingen. Die retrospektiv ausgewerteten Daten (klinische und molekulargenetische) entstammen der Routinediagnostik. Die klinischen Daten wurden anhand eines standardisierten Fragebogens erhoben.

In unserem Kollektiv waren *TSC2*-Mutationen etwa 4 mal häufiger als *TSC1*-Mutationen, eine Beobachtung, die in ähnlicher Weise schon in früheren Studien gemacht wurde. Zusammenfassend zeigt sich, dass auch in dieser Arbeit die Vermutung bekräftigt wird, *TSC2*-Mutationen führen insgesamt gesehen zu einem schwerer betroffenen Phänotyp als *TSC1*-Mutationen. Anhaltspunkte hierfür sind, das wesentlich jüngere Alter bei genetischer Testung, sowie ein häufigeres Vorkommen von renalen Hamartomen und extrarenalen Hamartomen. Lediglich im Bezug auf zentralnervöse Manifestationen (die auch mit schwereren Verläufen einhergehen), zeigten sich in diesem Kollektiv keine signifikanten Unterschiede zwischen *TSC1* und *TSC2*.

Zusätzlich bekräftigt wird die Hypothese des schwerwiegenderen Phänotyps bei *TSC2* durch unser Ergebnis, dass es in Folge von PT-Mutationen bei *TSC2* zu einem deutlich beeinträchtigteren Phänotyp kommt, verglichen mit PT-Mutationen bei *TSC1*.

Ähnliche Schlüsse lassen die Ergebnisse aus den Vergleichen zwischen sporadisch entstandenen Mutationen und familiär ererbten Mutationen zu. Sporadische Fälle zeigen häufiger zentralnervöse Symptome (Tubera und Heterotopien) sowie renale Manifestationen (AML und Zysten) und eine kardiale Mitbeteiligung durch Rhabdomyome. Außerdem sind Patienten mit sporadischem TSC bei genetischer Testung signifikant jünger. Somit ergibt sich die These, dass ein sporadisch entstandener TSC mit einem deutlich ernsthafteren Krankheitsbild einhergeht.

Zudem waren im vorliegenden Kollektiv sporadische Mutationen viermal häufiger im *TSC2*-Gen, das mit einem schwerer wiegenden Phänotyp assoziiert wird. Erklärt werden kann der Unterschied im Schweregrad zwischen sporadischen und familiären Fällen am besten durch die eingeschränkte Fertilität schwerer Betroffener.

Bezogen auf die einzelnen Mutationstypen, waren auch in dieser Arbeit eine stringente Korrelation zum Phänotyp und eine exakte Prädiktion des Krankheitsverlaufes nicht möglich. Es zeigte sich aber, dass im

*TSC2*-Gen keine signifikanten Unterschiede des Phänotyps bestanden im Vergleich von translationalen Stopp-Mutationen zu Aminosäureaustauschen ohne Leseraster-Verschiebung. Hieraus ergibt sich die Vermutung, dass Tuberin im funktionalen Heterodimer mit Hamartin die "tragendere" Rolle zukommt. Desweiteren waren im *TSC2*-Gen große Deletionen signifikant häufiger mit einer Nierenbeteiligung vergesellschaftet als "kleine" Punktmutationen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass bei einem Drittel der Patienten mit genomischer Deletion des *TSC2* ein Contiguous-Gene-Syndrome vom Typ *TSC1/PKD1* mit polyzystischer Nierenkrankheit vorlag.

Ein Vergleich der Mutationstypen (insbesondere PT-Mutationen) bezogen auf das Gen (*TSC1* oder *TSC2*) erbrachte einen schwerwiegenderen Phänotyp bei Mutation im *TSC2*-Gen. Somit schließt sich der Kreis zur These der schwereren Ausprägung bei *TSC2*-Mutationen.

In den Vergleichen zwischen Patienten mit und ohne Mutationsnachweis (MI, NMI) zeigte sich vor allem, dass NMI-Fälle einen vielfach milderen Phänotyp präsentieren. In unseren Ergebnissen ähnelte der NMI-Phänotyp stark demjenigen mit *TSC1*-Mutationen und ist im Vergleich zum Phänotyp der *TSC2*-Mutationen deutlich milder.

Ein positiver Mutationsnachweis wird wahrscheinlicher, je mehr Symptome vorliegen. Gründe für das Versagen eines Mutationsnachweises könnten Mutationen in den nicht-kodierenden Regionen (und damit außerhalb der untersuchten Bereiche), das Vorliegen eines somatischen Mosaiks oder -aber eher unwahrscheinlich- ein bisher unbekanntes TSC-Gen sein.

Bezüglich des Geschlechts ergaben sich kaum nennenswerte Unterschiede der Symptome zwischen männlichen und weiblichen Patienten. Auch im hier vorliegenden Kollektiv ist die LAM streng an das weibliche Geschlecht geknüpft, was die Theorie einer Beeinflussung durch Geschlechtshormone unterstützt. Das gehäufte Auftreten von Rhabdomyomen bei männlichen Patienten innerhalb dieser Studie ließ sich - unter Berücksichtigung der aktuellen Forschungslage - nicht sinnvoll erklären. Es bestätigte sich jedoch, dass Rhabdomyome eines der am frühesten beobachteten Symptome sind.

Im Hinblick auf die angewandten Methoden zeigte sich, dass weiterhin die konventionelle Sanger-Sequenzierung der Goldstandard für Punktmutationen ist. Es wurde aber auch klar, wie wichtig Kombinationen aus mehreren Verfahren, sowie ein gestaffeltes Vorgehen sind. Desweiteren zeichneten sich bereits erste positive Erfahrungen mit den neuen Methoden des NGS ab, die vor allem Hoffnung für die bisherigen NMI-Fälle machen.

Zusammenfassend gelang es in dieser Arbeit, die Ergebnisse aus vorangegangenen Genotyp-Phänotyp-Korrelationsstudien zu reproduzieren und somit deren Richtigkeit zu bekräftigen. Auch weiterhin bleibt eine Prädiktion des Phänotyps bezogen auf den einzelnen, individuellen Genotyp versagt. Es können aber mit Sicherheit Aussagen über den erwarteten Krankheitsverlauf getroffen werden im Bezug auf Gen, Art der Entstehung und Geschlecht.

## 6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TSC	Tuberöse Sklerose Komplex, Tuberous Sclerosis Complex
LOVD	Leiden Operation Variation Database
mTOR	mammalian target of rapamycin
ITSCCC	International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference
ZNS	Zentralnervensystem
SEN	subependymale Gliaknoten, subependymal nodules
SEGA	subependymale Riesenzellastrozytome, subependymal giant cell astrocytomas
AML	Angiomyolipome
PKD1	polycystic kidney disease 1
NCC	Nierenzellkarzinom
LAM	Lymphangioliomyomatose
S-LAM	Sporadische Lymphangioliomyomatose
4E-BP1	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
S6K	die S-6-Kinase
Rheb	Ras homologue enriched in brain
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
PKB	Proteinkinase B
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängigen Proteinkinase AMPK
LOH	Loss of Heterozygosity
PCR	Polymerasekettenreaktion
MLPA	multiplex ligation-dependent probe amplification
CMA	chromosomaler Microarray
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
NGS	Next Generation Sequencing
NMI	No mutation identified
MI	Mutation identified
MRT	Magnetresonanztomographie
CT	Computertomographie
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
SSCP	Single-strand conformation polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
DNA	Desoxyribonukleinsäure/-acid
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
TAND	TSC Associated Neuropsychiatric Disorders

ddNTP	2'-3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
HGVS	Human Genome Variation Society
SD	Standardabweichung
FA	Faziale Angiofibrome
HM	Hypomelanotische Flecken
SP	Chagrin Haut (Shagreen Patch)
UF	Unguale Fibrome
TUB	Tubera der Hirnrinde
SEN	Subependymale Gliaknoten
SEGA	Subependymale Riesenzellastrozytome
AML	Angiomyolipome (renale)
RH	Retinale Hamartome
CRM	Kardiale Rhabdomyome
LAM	Lymphangiomeiomyomatose
CON	Konfettflecken der Haut
CRML	Radiale Heterotopien der weißen Hirnsubstanz
RC	Renale Zysten
AP	Achromatischer Fleck der Netzhaut
GF	Gingivafibrome
DEP	Zahnschmelzdefekte (dental enamel pits)
RP	Hamartomartige Rektumpolypen
HAM	Hamartome außerhalb der Niere
BC	Knochenzysten (bone cysts)
TOSCA	Tuberous Sclerosis Registry to Increase Disease Awareness



# 7 ANHANG

## 7.1 STANDARDISIERTER FRAGEBOGEN ZU KLINISCHEN DIAGNOSEKRITERIEN

ZENTRUM FÜR HUMANGENETIK UND LABORATORIUMSMEDIZIN • LOCHHAMERSTR. 29 • 82152 MARTINSRIED  
Dr. Klein und Dr. Rost

Ableitung:                      Molekulargenetik:                      Klinische Genetik/Genetische Beratung:  
Tel.: +49.89.895578-0                      Dr. rer. nat. Christoph Marschall                      Dr. med. Inera Rost  
Fax: +49.89.895578-780                      Dr. rer. nat. Karin Mayer



Akreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025, DIN EN ISO 15189, European Fed. of Immunogenetics (EFI)

### Tuberöse Sklerose

Retrospektive Erfassung klinischer Daten

**Patientenangaben**

Name, Vorname: \_\_\_\_\_

Geburtsdatum: \_\_\_\_\_ Geschlecht:  m  w

Straße: \_\_\_\_\_

PLZ, Wohnort: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

**Behandelnder Arzt (Stempel) - Unterschrift**

Einverständniserklärung und Stammbauminformation auf der Rückseite

**Diagnostische Kriterien für Tuberöse Sklerose Typ 1 (TSC1) und Typ 2 (TSC2):**  
[mod. nach Roach et al, Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria, J Child Neurol (1998)]

Organsystem	Hauptkriterien	Nebenkriterien
Haut	<input type="checkbox"/> Faziale Angiofibrome oder Stirnplaque <input type="checkbox"/> 3 oder mehr hypomelanotische Flecken <input type="checkbox"/> Chagrin-Haut <input type="checkbox"/> Nicht-traumatische Nagelfalz-Tumore	<input type="checkbox"/> Konfetti-Flecken der Haut
ZNS	<input type="checkbox"/> Tubera der Hirnrinde (1) <input type="checkbox"/> Subependymale Gliaknoten <input type="checkbox"/> Riesenzellastrzytom	<input type="checkbox"/> Radiale Heterotopien in der weißen Hirnsubstanz (1)
Nieren	<input type="checkbox"/> Angiomyolipom (2)	<input type="checkbox"/> Mehrere Nierenzysten
Augen	<input type="checkbox"/> Mehrere Hamartome der Netzhaut	<input type="checkbox"/> Unpigmentierter Fleck der Netzhaut
Herz	<input type="checkbox"/> Kardiale Rhabdomyome (eines oder mehrere)	
Lunge	<input type="checkbox"/> Pulmonale Lymphangiomyomatose (2)	
Mundhöhle		<input type="checkbox"/> Zahnfleischfibrome <input type="checkbox"/> Mehrere, zufällig verteilte Zahnschmelzdefekte
Gastrointestinaltrakt		<input type="checkbox"/> Hamartomartige Rektumpolypen <input type="checkbox"/> Hamartome ausserhalb der Niere
Skelett		<input type="checkbox"/> Knochenzysten

(1) Wenn Tubera der Hirnrinde und Heterotopien in der weißen Substanz zusammen auftreten sollen sie als ein Kriterium gewertet werden.  
 (2) Bei Vorhandensein von pulmonaler Lymphangiomyomatose und renaler Angiomyolipomatose sollen weitere Kriterien einer TSC nachgewiesen werden, bevor die klinische Diagnose TSC als gesichert gelten kann.

TSC gesichert:                      2 Hauptkriterien oder 1 Hauptkriterium und 2 Nebenkriterien  
 TSC wahrscheinlich:                      1 Hauptkriterium und 1 Nebenkriterium  
 TSC möglich:                      1 Hauptkriterium oder 2 Nebenkriterien

MVZ Martinsried  
Lochamer Str. 29  
D-82152 Martinsried

Tel. +49.89.895578-0  
Fax +49.89.895578-780  
info@medizinische-genetik.de

www.medizinische-genetik.de  
Kostenloses Service-Telefon: 0800-GENETIK



Deutsche  
Akkreditungsgesellschaft  
D-MU-13317-01-00  
D-PI-13317-01-00



**Ableitung:**

Tel.: +49.89.895578-0  
Fax: +49.89.895578-780

**Molekulargenetik:**

Dr. rer. nat. Christoph Marschall  
Dr. rer. nat. Karin Mayer

**Klinische Genetik/Genetische Beratung:**

Dr. med. Imma Rost

**Symbole**

weiblich	männlich
nicht betroffen	
betroffen	
verstorben	
Überträger	
Geschlecht nicht festgelegt	Schwangerschaft
Spontanabort	Schwangerschaftsabbruch
Einziges Zwillinge	Zweieiige Zwillinge
Indepatient	Infermität

**Stammbaum**

Bitte verwenden Sie die nebenstehenden Symbole

**Einwilligungserklärung für eine wissenschaftliche Datenauswertung**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Die Verwendung menschlicher Blutproben, Gewebeproben oder anderer Untersuchungsmaterialien menschlichen Ursprungs zu wissenschaftlichen Zwecken unterliegt den geltenden ethischen Regeln für medizinische Forschung. Diese sind in der Deklaration von Helsinki (World Medical Association 2000) allgemein formuliert. Eine wirksame „Einwilligung nach Aufklärung“ durch diejenige Person, von der eine Probe stammt, wird im internationalen Sprachgebrauch als „Informed consent“ bezeichnet. Für ethisch vertretbare Forschung an Gewebeproben von Patienten ist die nach Aufklärung gegebene Einwilligung von zentraler Bedeutung. Dies gilt auch für den Gebrauch von Proben, die zunächst zu diagnostischen Zwecken und deshalb nicht oder nicht ausschließlich zu Forschungszwecken gewonnen werden bzw. wurden.

Selbstverständlich unterliegen Ihre Angaben und die Untersuchungsergebnisse der Ärztlichen Schweigepflicht.

Mit Ihrer nachstehenden Unterschrift bestätigen Sie, dass

- Sie von Ihrem behandelnden Arzt über Aussagekraft und Konsequenzen der genetischen Untersuchung aufgeklärt wurden,
- Ihnen ausreichend Bedenkzeit vor Einwilligung in die genetische Untersuchung eingeräumt wurde,
- Sie mit der Entnahme von Untersuchungsmaterial und der Durchführung der von Ihrem behandelnden Arzt angeforderten genetischen Untersuchung einverstanden waren / sind,
- Sie mit der anonymisierten Auswertung Ihrer Untersuchungsergebnisse für wissenschaftliche Zwecke einverstanden sind.

Ort, Datum

Unterschrift Patientin/Patient bzw. Erziehungsberechtigte(r)

Unterschrift behandelnde(r) Ärztin/Arzt

MVZ Martinsried  
Lochhamer Str. 29  
D-82152 Martinsried



Tel. +49.89.895578-0  
Fax +49.89.895578-780  
info@medizinische-genetik.de

www.medizinische-genetik.de  
Kostenloses Service-Telefon: 0800-GENETIK



Akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025, DIN EN ISO 15189, European Fed. of Immunogenetics (EFI)

## 7.2 PATIENTENINFORMATIONEN UND EINWILLIGUNGSERKLÄRUNGEN

	<b>KLINIKUM</b> DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN	CAMPUS INNENSTADT KINDERKLINIK UND KINDERPOLIKLINIK IM DR. V. HAUNERSCHEN KINDERSPITAL DIREKTOR: PROF. DR. C. KLEIN	
<small>Kliniken der Universität München - Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. v. Haunerschen Kinderspital, Liebigstr. 4, 80337 München</small>			
<b>Patienteninformation und Einwilligungserklärung für Erwachsene</b>			
1. Titel des geplanten Forschungsvorhabens:			
<i>Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Vergleich von unterschiedlichen Analysetechniken in der Diagnostik bei Patienten mit Tuberöser Sklerose</i>			
2. Überblick über den derzeitigen Stand der Forschung:			
Sehr geehrte Patientin / sehr geehrter Patient / sehr geehrte Eltern,			
die Tuberöse Sklerose ist eine Erkrankung, die durch <i>eine Veränderung</i> (eine Mutation) in der menschlichen Erbsubstanz bedingt ist. Solch eine Mutation kann entweder neu in der befruchteten Eizelle während der Entwicklung des Embryos vor der Geburt entstehen oder von einem Elternteil vererbt sein. Die Tuberöse Sklerose betrifft viele Organe, vor allem das Gehirn, die Haut, Herz und Lungen, sowie die Nieren. Durch das Erscheinungsbild der Krankheit kann sie bereits in vielen Fällen diagnostiziert werden. Zusätzlich kann aber die Diagnose gesichert werden, indem man die krankheitsverursachende Mutation im Erbgut nachweist.			
Bei Ihnen/Ihrem Kind wurde eine solche Mutationsanalyse im Rahmen der Routinediagnostik zur Sicherung der klinischen Diagnose durchgeführt und die krankheitsverursachende Mutation gefunden.			
Derzeit sind bereits viele krankheitsauslösende Erbgutveränderungen bei Tuberöser Sklerose bekannt, die allerdings zu sehr unterschiedlichen Symptomen der Krankheit führen können. Je nach Ort und Art der Mutation können sehr milde Beeinträchtigungen bestehen oder aber eine schwere Erkrankung vorliegen. <i>Nach aktuellem Kenntnisstand ist es noch schwierig, der nachgewiesenen Mutation die zu erwartende Schwere des Verlaufs zuzuordnen, da hier große Variabilität vorhanden ist. Dies bedeutet, dass gegenwärtig eine Korrelation der individuellen Gesamtheit der Erbsubstanz (GENOTYP) mit dem Erscheinungsbild als Summe aller Merkmale eines Organismus (PHÄNOTYP) noch schwierig ist.</i> Für eine gute genetische Beratung von Betroffenen und Familienangehörigen wäre aber eine solche Genotyp-Phänotyp-Korrelation sehr wünschenswert.			
3. Ziele des geplanten Forschungsvorhabens			
Im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit an der Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der LMU München sollen anhand einer großen Anzahl an Patienten mit TSC und nachgewiesener TSC-Mutation die genetischen Daten und der Krankheitsverlauf miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse und die von Ihrem betreuenden Arzt zur Verfügung gestellten klinischen Untersuchungsbefunde liegen im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin in Martinsried vor.			
<small>Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des Öffentlichen Rechts. Vorstand: Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Burkhard Göke (Vorsitz), Kaufmännischer Direktor: Gerd Koslowski, Pflegedirektor: Peter Jacobs, Vertreter der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser (Dekan) Institutionskennzeichen: 260 914 050, Umsatzsteuer-Identifikationsnummer gemäß §27a Umsatzsteuergesetz: DE 813 536 07</small>			

Durch die Zusammenführung der molekulargenetischen mit den klinischen Daten erhoffen wir uns, einen Zusammenhang zwischen betroffenem Gen, Mutationsart und Schwere des Krankheitsbildes ausfindig zu machen und diesen Zusammenhang durch die hohe Fallzahl, die uns vorliegt, zu untermauern.

#### 4. Erläuterung des Studiendesigns

In unserer Studie sollen die klinischen und genetischen Daten von Ihnen (Ihrem Kind) zunächst pseudonymisiert (mit einem unabhängigen Zahlencode verschlüsselt) zusammengeführt werden, d.h. ohne dass ein Rückschluss auf Ihre Person möglich ist. Zu einem großen Teil liegen uns Ihre klinischen Befunde bereits vor, es kann jedoch in einzelnen Fällen sein, dass diese fehlen und wir bei Ihren behandelnden Ärzten mit Ihrer Zustimmung um die Angabe von klinischen Informationen bitten. Nach der Zusammenführung der beiden Datensätze werden diese vollständig anonymisiert und für die Erarbeitung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation statistisch ausgewertet.

#### 5. Durchführung des Forschungsvorhabens

Sobald alle noch fehlenden Unterlagen und Einwilligungen vorliegen, kann mit der Studie begonnen werden. Da Ihre molekulargenetischen Daten bereits vorliegen, entsteht Ihnen kein Aufwand für etwaige zusätzliche Untersuchungen/Blutentnahmen. Sämtliche Unterlagen und Informationsmaterialien erhalten sie über Ihren behandelnden Arzt auf dem Postwege. Die Studie soll in einem Zeitraum von 6 Monaten durchgeführt werden.

#### 6. Risiko-Nutzen-Abwägung

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation (*Vergleich der Gesamtheit der Erbsubstanz einschließlich individueller Mutationen mit der klinischen Ausprägung bzw. dem individuellen Erscheinungsbild der Erkrankung*) würde die genetische und prognostische Beratung der Familie verbessern. Dies wiederum könnte zu einer besseren, frühzeitigeren und individuelleren Therapieplanung führen (z.B. Einsatz und Dosierung von neuen Medikamenten).

Es handelt sich um eine rein rückblickende Auswertung Ihrer Daten, die in der Routinediagnostik bereits erhoben wurden. Es besteht für Sie kein gesundheitliches Risiko und sie werden nicht durch zusätzliche Untersuchungen belastet. Der Schutz Ihrer sensiblen persönlichen Daten wird so groß wie möglich gehalten durch die initiale Verschlüsselung der personenbezogenen Daten (Pseudonymisierung), Zugriffsbeschränkung und letztendliche Anonymisierung (wodurch keine Zuordnung zur Person mehr möglich ist).

Aus den Ergebnissen des Forschungsprojektes werden sich für Sie keine unmittelbaren Änderungen Ihrer derzeitigen Therapie ergeben.

Ihnen entstehen zwar durch die Studie keine unmittelbaren Vorteile, die Ergebnisse dieser Studie können aber als Grundlage für die weitere Untersuchung und somit für das bessere Verständnis und so auch bessere Behandlungsmöglichkeiten der Erkrankung dienen.

#### 7. Andere Behandlungsmöglichkeiten

Entfällt

#### 8. Hinweis auf den Abschluss einer Probandenversicherung

Entfällt

#### 9. Bei Frauen im gebärfähigen Alter: Durchführung eines Schwangerschaftstests

Entfällt

#### 10. Auswertung der erhobenen Daten/Datenweitergabe

Im Rahmen der Studie werden die Bestimmungen zur ärztlichen Schweigepflicht der Musterberufsordnung und zum Datenschutz gemäß Bundesdatenschutzgesetz eingehalten.

Sämtliche Maßnahmen unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht. Ein Datentransfer an Dritte (z.B. Krankenversicherer, Lebensversicherungen) erfolgt zu keiner Zeit.

Siehe gesonderte datenschutzrechtliche Einverständniserklärung.

#### 11. Freiwilligkeit der Teilnahme

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.

#### 12. Rücktrittsklausel

Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen.

#### 13. Aufklärender Arzt

Die Kontaktaufnahme und Weiterleitung sämtlicher Informationen erfolgt ausschließlich über Ihren behandelnden Arzt. Bei Rückfragen können Sie sich gerne an die Studienleiter Herrn Prof. Walther, Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital oder Frau Dr. Karin Mayer, Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin in Martinsried wenden.

Kontakt/Studienleitung:  
Prof. Dr.med. J.-U. Walther M.Sc.  
Kinderklinik und Kinderpoliklinik  
im Dr. von Haunerschen Kinderspital

der Ludwig Maximilian Universität München  
Lindwurmstr. 4  
80337 München  
Tel.: 089/5160 2811  
Email: Ju.Walther@med.uni-muenchen.de

Dr. rer. nat. Karin Mayer  
Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin  
Dr. Klein und Dr. Rost  
Lochhamer Str. 29  
82152 Martinsried  
Tel.: 089/8955780  
Email: Karin.Mayer@medizinische-genetik.de

#### 14. Ausgabe der Patienteninformation

Die Patienteninformation wird Ihnen zum Verbleib ausgehändigt.

München, den 02.12.2011

Unterschrift

Prof. Dr.med. J.-U. Walther M.Sc.

**Einwilligungserklärung**

**Ich erkläre hiermit, dass ich an der Studie**

*Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Vergleich von unterschiedlichen Analysetechniken in der Diagnostik bei Patienten mit Tuberöser Sklerose*

teilnehmen möchte.

- Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig
- Der Abschluss einer Probandenversicherung entfällt
- Es handelt sich um die Übernahme und Verwendung bereits vorhandener Daten

- **Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung:**

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, verschlüsselt und gespeichert. Auf diese Weise erscheinen weder Ihr Name, noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum im Verschlüsselungscode. Für die Auswertung der wird diesen zusätzlich mit einem technischen Verschlüsselungsverfahren ein Wert zugeordnet, der nicht mehr rückverwandelt werden kann (Hash-Wert).

Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden Ihre Daten für die Studie nicht verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode im Rahmen der Studie ist auf folgende Personen beschränkt:

Frau Dr. rer. nat. Karin Mayer (Studienleitung) und Frau Maria Schmid (Doktorandin cand. med.). Da die Befunde primär zu diagnostischen Zwecken erhoben wurden, müssen sie gemäß der in der Musterberufsordnung (MBO), §15 Abs. 2 geregelten Aufbewahrungspflicht für mindestens 10 Jahre im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Lochhamer Str. 29, 82152 Martinsried gespeichert werden.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

- Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen.

Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.

Ort, Datum

Unterschrift Patient/in

Unterschrift aufklärende/r Arzt/in

Unterschrift gesetzlicher Vertreter (falls gegeben)



## Patienteninformation und Einwilligungserklärung für Kinder und Jugendliche

### 1. Titel des geplanten Forschungsvorhabens:

*Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Vergleich von unterschiedlichen Analysetechniken in der Diagnostik bei Patienten mit Tuberöser Sklerose*

### 2. Überblick über den derzeitigen Stand der Forschung:

Liebe Patientin, lieber Patient,

Tuberöse Sklerose ist eine Krankheit, bei der ein Gen verändert ist. Gene sind der Bauplan des Lebens, der in jeder Zelle deines Körpers enthalten ist. Sie bestehen aus DNA, das ist eine Abfolge von vielen tausenden Buchstaben, die von der Zelle gelesen werden können. Und daraus kann die Zelle dann für Deinen Körper Eiweißbausteine herstellen. Bei Dir ist es *eine Veränderung* im Bauplan von einem zweier Gene. Die zwei Gene heißen TSC1 und TSC2. *Diese Veränderung* führt dazu, dass die Zellen nicht mehr richtig funktionieren, weil sie nicht mehr die richtigen Eiweißbausteine herstellen können.

Wegen dieser *Veränderungen* in Deinem Körper bekommst du die Beschwerden, die von deinem Arzt behandelt werden.

Die Suche nach *Veränderung* im Bauplan von TSC1 oder TSC2 ist sehr schwierig für die Forscher, weil *sie* oft sehr klein *ist*. Die Forscher müssen jeden Buchstaben der Gene TSC1 und TSC2 lesen und mit der Buchstabenabfolge bei gesunden Personen vergleichen, um *Veränderungen* zu finden.

Derzeit sind bei verschiedenen Patienten mit Tuberöser Sklerose sehr viele solcher *Veränderungen* in den beiden Genen TSC1 und TSC2 bekannt. Allerdings führen die unterschiedlichen *Veränderungen* zu unterschiedlich starker Ausprägung der Krankheit. Die Art *der Abweichung* wird dabei als Genotyp bezeichnet und die Beschwerden der Krankheit als Phänotyp, der Zusammenhang von beidem als Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Je nachdem, wo in den beiden Genen etwas falsch ist und wie die Art *der Veränderung* ist (zu wenige oder zu viele Buchstaben), können wenige Beschwerden bestehen oder aber man ist kränker und viele Organe funktionieren nicht richtig. Wenn man aber genau wüsste, welche *Art von Veränderung* zu welchem Verlauf der Krankheit führt, könnte man die kranken Kinder und ihre Eltern besser beraten und ihnen erklären, wie sich die Krankheit im Laufe des Lebens entwickeln wird.

### 3. Welches sind die Ziele des geplanten Forschungsvorhabens

Die Forscher haben bereits angefangen, eine Verknüpfung zwischen den *Veränderungen* und den Beschwerden herzustellen, weil es aber so viele verschiedene *Veränderungen* gibt und die Krankheit so unterschiedlich schwer sein kann, ist das noch sehr schwierig. Wir haben schon

viele Patienten untersucht, von denen wir sehr viel Information haben. Mit so einer großen Anzahl an Patienten ist es viel wahrscheinlicher, einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen *Veränderungen* und der Ausprägung der Erkrankung zu finden. Deswegen möchten wir gerne die Information, die wir über Dich und all die anderen Patienten haben auswerten und nach solchen Zusammenhängen suchen.

4. Wie ist die Studie aufgebaut

In unserer Studie sollen die Informationen über Deine Beschwerden, die wir von Deinem Arzt wissen, in Verbindung gebracht werden zu *der Veränderung*, die wir bei Dir in einem der zwei Gene gefunden haben. Weil wir alle Informationen und Untersuchungen bereits haben, die wir gerne bewerten wollen, nennt man diese Art von Forschungsvorhaben eine rückblickende Studie. Wir schauen uns Untersuchungen an, die schon gemacht wurden. Falls uns noch Informationen zu Deinen Beschwerden fehlen, wenden wir uns an Deinen Arzt, der Dich gut kennt, und bitten ihn, uns diese Informationen nachzuliefern, wenn Du damit einverstanden bist.

5. Wie soll die Studie durchgeführt werden

Mit der Studie soll so bald wie möglich begonnen werden. Da wir die von Dir benötigten Daten aus Deiner früheren Untersuchung bereits haben, musst Du deswegen nicht noch einmal zu Deinem Arzt gehen für zusätzliche Untersuchungen oder Blutentnahmen. Die Studie soll in einem Zeitraum von 6 Monaten durchgeführt werden.

6. Gibt es Risiken und welchen Nutzen hat die Studie

Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation, also eine Verknüpfung von *Art der Veränderung* und Krankheitsbild, würde die Beratung der Familie verbessern. Dadurch könnte man besser und auch frühzeitiger eine Therapie, z. B. mit neuen Medikamenten, planen und diese auch passend zu jeder einzelnen Person.

Es handelt sich um eine rein rückblickende Auswertung Deiner Daten, die bei uns bereits vorliegen. Für Dich gibt es kein gesundheitliches Risiko und Du musst keine zusätzlichen Untersuchungen machen.

Zunächst werden sich für Dich daraus keine unmittelbaren Änderungen deiner derzeitigen Behandlung ergeben.

Es entstehen dir zwar durch die Studie keine besonderen Vorteile, die Ergebnisse dieser Studie können aber als Grundlage für weitere Forschungen dienen, damit wir in Zukunft Deine Krankheit noch besser verstehen und vielen kranken Menschen dadurch noch besser helfen können.

7. Andere Behandlungsmöglichkeiten

Entfällt

8. Hinweis auf den Abschluss einer Probandenversicherung

Entfällt

9. Bei Frauen im gebärfähigen Alter: Durchführung eines Schwangerschaftstests

Entfällt

10. Auswertung der erhobenen Daten/Datenweitergabe

Die Informationen, die wir von dir haben, werden nicht an andere Personen weitergegeben. Außerdem werden wir, wenn wir die Ergebnisse aufschreiben, Deinen Namen und alles, was auf Dich Rückschlüsse erlaubt, löschen. So ist sicher gestellt, dass niemand die Informationen zu Deiner Krankheit für falsche Zwecke verwenden kann.

Siehe gesonderte datenschutzrechtliche Einverständniserklärung.



#### 11. Freiwilligkeit der Teilnahme

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig.

#### 12. Rücktrittsklausel

Du kannst jederzeit Dein Einverständnis zur Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Du einen Grund dafür angeben musst und ohne dass Dir dadurch irgendwelche Nachteile entstehen.

#### 13. Aufklärender Arzt

Die Kontaktaufnahme und Weiterleitung sämtlicher Informationen erfolgt ausschließlich über Deinen Arzt, der Dich kennt. Bei weiteren Fragen kann Dein Arzt sich gerne an die Studienleiter Herrn Prof. Walther, Kinderklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital oder Frau Dr. Karin Mayer, Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin in Martinsried wenden.

Kontakt/Leitung der Studie:

Prof. Dr.med. J.-U. Walther M.Sc.

Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital

der Ludwig Maximilian Universität München

Lindwurmstr. 4

80337 München

Tel.: 089/5160 2811

Email: Ju.Walther@med.uni-muenchen.de

Dr. rer. nat. Karin Mayer

Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin

Dr. Klein und Dr. Rost

Lochhamer Str. 29

82152 Martinsried

Tel.: 089/8955780

Email: Karin.Mayer@medizinische-genetik.de

#### 14. Ausgabe der Patienteninformation

Du darfst dieses Informationsblatt behalten.

München, den 02.12.2011

Unterschrift

Prof. Dr.med. J.-U. Walther M.Sc.

**Einwilligungserklärung**

**Ich erkläre hiermit, dass ich an der Studie**

*Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Vergleich von unterschiedlichen Analysetechniken in der Diagnostik bei Patienten mit Tuberöser Sklerose*

teilnehmen möchte.

- Die Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig
- Der Abschluss einer Probandenversicherung entfällt
- *Es handelt sich um die Übernahme und Verwendung bereits vorhandener Daten*
- *Die Einwilligung von Kindern und Jugendlichen ist zusätzlich zur elterlicher Einwilligung einzuholen*

- **Datenschutzrechtliche Einwilligungserklärung:**

Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Dich erhoben, verschlüsselt und gespeichert. Auf diese Weise erscheint weder Dein Name, noch Deine Initialen oder das exakte Geburtsdatum im Verschlüsselungscode. *Für die Auswertung der Daten wird diesen zusätzlich mit einem technischen Verschlüsselungsverfahren ein Wert zugeordnet, der nicht mehr rückverwandelt werden kann (Hash-Wert).*

Im Falle des Widerrufs Deiner/Ihrer Einwilligung werden Deine/Ihre Daten für die Studie nicht verwendet.

Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode im Rahmen der Studie ist auf folgende Personen beschränkt:

Frau Dr. rer. nat. Karin Mayer (Studienleitung) und Frau Maria Schmid (Doktorandin cand. med.). Da die Befunde primär zu diagnostischen Zwecken erhoben wurden, müssen sie gemäß der in der Musterberufsordnung (MBO), §15 Abs. 2 geregelten Aufbewahrungspflicht für mindestens 10 Jahre im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Lochhamer Str. 29, 82152 Martinsried gespeichert werden.

Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.

- *Du kannst / Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme an diesem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen.*

**Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.**

Ort, Datum

*Unterschrift Patient/in*

*Unterschrift aufklärende/r Arzt/in*

*Unterschrift Eltern / Sorgeberechtigte*

### 7.3 NOCH NICHT PUBLIZIERTE MUTATIONEN IN *TSC1* UND *TSC2*

Tabelle 25: Noch nicht publizierte Mutationen in *TSC1* und *TSC2*

Gen	Exon/ Intron	cDNA	gDNA	Protein
1	Exon 21	c.2771T>A		p.Leu924*
1	Exon 15	c.1709_1710delGGinsA		p.Arg570Lysfs*59
1	Exon 13	c.1327_1328insTGATC		p.Gly443Valfs*16
1	Exon 12	c.1202_1203delGT		p.Cys401Serfs*4
1	Exon 09	c.540G>A		p.Trp247*
1	Exon 09	c.802delG		p.Glu268Glnfs*5
1	Exon 09	c.809C>G		p.Ser270*
1	Exon 05	c.236_239dupATGT		p.Gly81Cysfs*29
1	Exon 04	c.193C>T		p.Gln65*
1	Exon 04	c.208A>T		p.Lys70*
1	Exon 04	c.193C>T		p.Gln65*
1	Intron 07	c.664-10A>G		
1	Exon 21	c.2702_2703dupAG		p.Leu902Glyfs*30
1	Exon 21	c.2651dupA		p.Tyr884*
1	Exon 18	c.2388_2389dupA		p.Gln797Thrfs*29
1	Exon 14	c.1434delA		p.Glu479Lysfs*53
1	Exon 09	c.1023_1045del23		p.Gly274Leufs*18
1	Exon 09	c.784delA		p.Ile262Serfs*56
1	Exon 07	c.566delA		p.His189Leufs*21
1	Exon 04	c.181-182delCT		p.Leu61Aspfs*8
1	Intron 10	c.1030-2A>G		
1	Intron 07	c.664-2A>T		
1	Exon 17	c.2099delA		p.Asn700Thrfs*22
1	Exon 15	c.1459dupT		p.Ser487Phefs*2
1	Exon 14	c.1435G>T		p.Glu479*
1	Exon 13	c.1326_1327delAG		p.Gly443Ilefs*15
1	Exon 09	c.740G>A		p.Trp247*
1	Exon 17	c.2101C>T		p.Gln701*
1	Intron 10	c.1029+3A>G	g.135786837A>G	
1	Exon 18	c.2380C>T		p.Gln794*
1	Exon 18	c.2374delC		p.Gln792Argfs*15
1	Exon 15	c.1562C>A		p.Ser521*
1	Exon 01- Exon 02	c.(?-15723)_(-6119_?)del	g.(?_135819982)_(135810378_135804243)del	
1	Intron 12	c.1264-1G>A		
1	Exon 21	c.2699_2700dupA		p.Arg901Glufs*3
1	Exon 21	c.2626dupG		p.Glu876Glyfs*28
1	Exon 15	c.1808dupC		p.Tyr604Valfs*2
2	Exon 27	c.3212C>T		p.Thr1071Ile

2	Intron 19-32	c.(2220+60-?)_(4006-1-?)del		
2	Intron 05	c.600-26G>A		
2	Exon 33	c.4393insG		p.Asp1465fs*
2	Exon 33	c.4070dupT		p.Ile1359Hisfs*55
2	Intron 37-Exon 38	c.5008-15_5015del23bp		
2	Intron 36	c.4849+1G>C		
2	Intron 35	c.4663-2A>G		
2	Intron 27-Exon 28	c.3285-26_c.3289del31bp		
2	Intron 21	c.2545+5G>T		
2	Intron 16	c.1840-4_1840-1delACAG		
2	Intron 15	c.1717-8_1717-5delCTCT		
2	Intron 13	c.1443+3_+8delGCGTGT		
2	Intron 13	1444-3C>A		
2	Exon 40	c.5204_5207dupTCTA		p.Pro1737Leufs*39
2	Exon 39	c.5132dupT		p.Ala1712Glyfs*17
2	Exon 39	c.5127dupC		p.Phe1710Leufs*19
2	Exon 39	c.5136_5152delCCGCCAGATGGCCCTGC		p.Ala1712fs*11
2	Exon 37	c.4909A>T		p.Lys1637*
2	Exon 36	c.4824C>A		p.Tyr1608*
2	Exon 36	c.4736dupG		p.Arg1580Profs*23
2	Exon 35	c.4617_4618delAT		p.Tyr1540Argfs*26
2	Exon 35	c.4640T>A		p.Val1547Asp
2	Exon 34	c.4509dupG		p.Leu1504Alafs*20
2	Exon 34	c.4537_4541delGAGTC		p.Glu1513Lysfs*11
2	Exon 34	c.4541C>G		p.Ser1514*
2	Exon 33	c.4347_4350insC		p.Arg1451fs*73
2	Exon 33	c.4404_4411delATCACGCAinsTGC		p.Ser1469Alafs*53
2	Exon 33	c.4439dupT		p.Leu1480Phefs*44
2	Exon 33	c.4253C>G		p.Ser1418*
2	Exon 33	c.4433_4436delACGC		p.Asp1478Alafs*2
2	Exon 33	c.4218dupCGAC		p.Val1407Argfs*7
2	Exon 32-Exon 37		g.2133732_2136789del3058	
2	Exon 32	c.3950dupT		p.Leu1317Phefs*
2	Exon 32	c.3982_3984delAGGinsC		p.Arg1328fs*85
2	Exon 32	c.3987_3990dupCACG		p.Asp1331Argfs*83

2	Exon 29	c.3526_3527insT		p.Pro1176Leufs*58
2	Exon 29	c.3515delG		p.Gly1172Alafs*20
2	Exon 29	c.3521insAA		p.Val1175Argfs*18
2	Exon 28- Exon 30	c.(3185_3300)_(3814_3845)del	g.(2129331_2129573)_(2131813_2132467)del	
2	Exon 28	c.3370dupG		p.Ala1124Glyfs*44
2	Exon 27	c.3181_3183delCTGinsGTCTGCTT		p.Leu1061delinsValLeuLeu
2	Exon 26	c.3033_3036dupTGAC		p.Asp1013*
2	Exon 26	c.3131G>C		p.Arg1044Thr
2	Exon 24	c.2812_2813dupAC		p.Ser939Leufs*10
2	Exon 24	c.2766_2767delGT		p.Leu922Phefs*4
2	Exon 22- Exon 30	c.(2546-?)_(3814-?)del		
2	Exon 21	c.2515dupA		p.Met839Asnfs*44
2	Exon 21	c.2370delC		p.Cys791Alafs*38
2	Exon 21	c.2367delC		p.Tyr790Thrfs*39
2	Exon 21	c.2448dupT		p.Asp817*
2	Exon 20	c.2263G>T		p.Glu755*
2	Exon 19	c.2211_2212delCT		p.Cys738Leufs*24
2	Exon 18	c.2034dupG		p.Val679Glyfs*22
2	Exon 18	c.1990delT		p.Ser664Leufs*34
2	Exon 17	c.1840G>C		p.Ala614Pro
2	Exon 17	c.1940_1942delACTinsC		p.Asp647Alafs*9
2	Exon 17	c.1842delC		p.phe615Leufs*83
2	Exon 15- Exon 21	c.(1600-?)_(2545-?)del		
2	Exon 15	c.1639G>T		p.Glu447*
2	Exon 15	c.1708_1711delATCC		p.Ile570Phefs*127
2	Exon 14	c.1520_1557del		p.Leu507Profs*?
2	Exon 14	c.1461C>G		p.Ser487*
2	Exon 13+Exon 39	[c.1384C>T(+)+c.5143A>G]		p.[Arg462Cys(+)]Met1715Val]
2	Exon 13	c.1436delT		p.Phe479Serfs*6
2	Exon 11	c.1191delG		p.Asn398Thrfs*27
2	Exon 10	c.1065_1068dupGGTG		p.Ala357Glyfs*30
2	Exon 09	c.855C>A		p.Tyr385*
2	Exon 05	c.573_577delCGACG		p.LLeu191fs*42
2	Exon 01	c.52_53delCT		p.Leu18Valfs*16
2	Exon 33	c.4145delT		p.Leu1382Argfs*29
2	Exon 32	c.3908delG		p.Gly1303Glufs*22
2	Exon 30	c.3754_3772del19		p.Ser1252Profs*67
2	Exon 30	c.3778_3779dupAC		p.Ala1261Argfs*65
2	Exon 01	c.47dupA		p.Ile17Aspfs*18

2	Exon 07	c.727_730insTTAA		p.Cys244Thrfs*95
2	Intron 07	c.775-7C>T		
2	Exon 38- Intron 38	c.5042_5086+5del32bp		
2	Exon 36	c.4736dupG		p.Arg1580Profs*23
2	Exon 32	c.3886delTinsCC		p.Ser1296Profs*26
2	Exon 24- Exon 33	c.(2743-?)(4493-?)del		
2	Exon 22	c.2579_2580delTT		p.Phe860Cysfs*22
2	Exon 07	c.716_732del17bp		p.Phe239Serfs*93
2	Exon 03	c.286G>T		p.Glu96*
2	Exon 01	c.64G>T		p.Gly22*
2	Exon 01- 41 TSC2/PK D1	(c.(?_1)(5424_?)del, TSC2); (c.(?_ 12909)(1_?)del, PKD1)	Chr16:g.(?_2098617)(218569 0_?)del	
2	Intron 15-32	c.(1716+60-?)(4006-1- ?)del		
2	Intron 39	c.5160+2T>G		
2	Intron 34	c.4569+1insA		
2	Exon 20	c.2355G>A		p.Gln785Gln
2	Exon 20	c.2355G>A		p.Gln785Gln
2	Exon 10- Exon 15	c.(?_1001)(1692_?)del		
2	Exon 01- 02	c.(?_1)(225_?)del	g.(?_2098001)(2100491_210 3290)del	
2	Intron 39	c.5160+2T>G		
2	Intron 19	c.2221-2A>T		
2	Exon 22	c.2615_2618dupCCCT		
2	Exon 01- 21	c.(?_1)(2545_?)del		

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: MRT des Gehirns mit Tubera und SEN (aus [89]).....	3
Abbildung 2: Faziale Angiofibrome (aus [89]) .....	4
Abbildung 3: Chagrin-Haut (Pflastersteinnaevus, Shagreen-Patch) (aus [89]) .....	5
Abbildung 4: Pathologisch-anatomisches Präparat einer Niere mit großen Hamartommassen (aus [89]).	6
Abbildung 5: mTOR-Signalkaskade.....	10
Abbildung 6 Verteilung der Mutationstypen in <i>TSC1</i> .....	12
Abbildung 7 Verteilung der Mutationstypen in <i>TSC2</i> .....	13
Abbildung 8 Altersverteilung.....	31

Abbildung 9 TSC1:TSC2-Ratio .....	33
Abbildung 10: Häufigkeit der Mutationstypen in <i>TSC1</i> in Prozent.....	38
Abbildung 11: Häufigkeit der Mutationstypen in <i>TSC2</i> in Prozent.....	38
Abbildung 12 Art und Verteilung der identifizierten Mutationen im <i>TSC1</i> -Gen, Stand 2011 ©Dr. K. Mayer .....	39
Abbildung 13 Art und Verteilung der identifizierten Mutationen im <i>TSC2</i> -Gen, Stand 2011 ©Dr. K. Mayer .....	40
Abbildung 14 Prozentualer Anteil der erfolgreich angewandten Methoden .....	41
Abbildung 15 Geschlechterverteilung bzgl. <i>TSC1</i> - und <i>TSC2</i> -Mutationen .....	45
Abbildung 16 Geschlechterverteilung in MI/NMI .....	46
Abbildung 17 Zusammenhang klinische Diagnose und Mutationsnachweis .....	52

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 Charakteristika von <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i> , modifiziert aus [18] .....	9
Tabelle 2 Klinische Diagnosekriterien nach [83] .....	15
Tabelle 3 Überarbeitete Diagnosekriterien für TSC 2012 (Neuerungen in Kursiv), modifiziert aus [72]...	16
Tabelle 4 Kontroll- und Management-Empfehlungen für neu diagnostizierten TSC oder Verdachtsfälle, modifiziert aus [51] .....	18
Tabelle 5 Kontrolle und Management bei Patienten mit bereits gestellter Diagnose, modifiziert aus [51] .....	18
Tabelle 6 Erhobene klinische Parameter.....	27
Tabelle 7 Indexpatienten.....	30
Tabelle 8 Alter in Jahren.....	31
Tabelle 9 Herkunft Indexpatienten .....	32
Tabelle 10 MI und NMI.....	33
Tabelle 11 Unklassifizierte Varianten.....	34
Tabelle 12 Anteil der Mutationstypen an <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i> bzw. der Gesamtheit MI .....	35
Tabelle 13 Einteilung der Mutationsgruppen .....	37
Tabelle 14 Methoden und Mutationstypen .....	41
Tabelle 15 Häufigkeit der Diagnosekriterien.....	44
Tabelle 16 Männer versus Frauen versus Ungeborene.....	46
Tabelle 17 Sporadisch vs. familiär .....	47
Tabelle 18: Sporadisch vs. familiär, p-Werte.....	48
Tabelle 19 <i>TSC1</i> vs. <i>TSC2</i> .....	48
Tabelle 20 <i>TSC1</i> vs. <i>TSC2</i> , p-Werte.....	49
Tabelle 21 <i>TSC2</i> -PT versus MS und Small Mut. versus genom. Del., <i>TSC1</i> -PT vs. <i>TSC2</i> -PT, p-Werte.....	51
Tabelle 22 Überblick MI vs. NMI .....	51
Tabelle 23 MI versus NMI, p-Werte .....	53
Tabelle 24 nicht signifikante Unterschiede von Diagnosekriterien m vs.w .....	57
Tabelle 25: Noch nicht publizierte Mutationen in <i>TSC1</i> und <i>TSC2</i> .....	77

## 10 LITERATURVERZEICHNIS

1. *Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16.* Cell, 1993. **75**(7): p. 1305-1315.
2. Au K.S., Williams A.T., Roach E.S., Batchelor L., Sparagana S.P., Delgado M.R., Wheless J.W., Baumgartner J.E., Roa B.B., and Wilson C.M., *Genotype/phenotype correlation in 325 individuals referred for a diagnosis of tuberous sclerosis complex in the United States.* Genetics in Medicine, 2007. **9**(2): p. 88-100.
3. Bateman J.F., Freddi S., Lamande S.R., Byers P., Nasioulas S., Douglas J., Otway R., Kohonen-Corish M., Edkins E., and Forrest S., *Reliable and sensitive detection of premature termination mutations using a protein truncation test designed to overcome problems of nonsense-mediated mRNA instability.* Hum Mutat, 1999. **13**(4): p. 311-317.
4. Bender R., Lange S., and Ziegler A., *Multipler Testen.* Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2007. **132**: p. e26-e29.
5. Berg H., *Vererbung der tuberösen Sklerose durch zwei bzw. drei Generationen.* Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie, 1913. **19**(1): p. 528-539.
6. Bissler J.J., McCormack F.X., Young L.R., Elwing J.M., Chuck G., Leonard J.M., Schmithorst V.J., Laor T., Brody A.S., and Bean J., *Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis.* New England Journal of Medicine, 2008. **358**(2): p. 140-151.
7. Bissler J.J., Kingswood J.C., Radzikowska E., Zonnenberg B.A., Frost M., Belousova E., Sauter M., Nonomura N., Brakemeier S., and de Vries P.J., *Everolimus for angiomyolipoma associated with tuberous sclerosis complex or sporadic lymphangiomyomatosis (EXIST-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial.* The Lancet, 2013. **381**(9869): p. 817-824.
8. Bough K.J. and Rho J.M., *Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet.* Epilepsia, 2007. **48**(1): p. 43-58.
9. Bourneville D., *Sclerose tubereuse des circonvolutions cerebrales: idiotie et epilepsie hemiplegique.* Arch Neurol (Paris), 1880. **1**: p. 81-91.
10. Camposano S.E., Greenberg E., Kwiatkowski D.J., and Thiele E.A., *Distinct clinical characteristics of tuberous sclerosis complex patients with no mutation identified.* Annals of Human Genetics, 2009. **73**(2): p. 141-146.
11. Choy Y., Dabora S., Hall F., Ramesh V., Niida Y., Franz D., Kasprzyk-Obara J., Reeve M., and Kwiatkowski D., *Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2.* Annals of Human Genetics, 1999. **63**(05): p. 383-391.
12. Chu-Shore C.J., Major P., Camposano S., Muzykewicz D., and Thiele E.A., *The natural history of epilepsy in tuberous sclerosis complex.* Epilepsia, 2010. **51**(7): p. 1236-1241.
13. Consortium E.C.T.S., *Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16.* Cell, 1993. **75**(7): p. 1305-1315.
14. Cook J., Oliver K., Mueller R., and Sampson J., *A cross sectional study of renal involvement in tuberous sclerosis.* Journal of Medical Genetics, 1996. **33**(6): p. 480-484.
15. Crino P.B., Nathanson K.L., and Henske E.P., *The tuberous sclerosis complex.* New England Journal of Medicine, 2006. **355**(13): p. 1345-1356.
16. Curatolo P. and Association I.C.N., *Tuberous sclerosis complex: from basic science to clinical phenotypes.* 2003: Mac Keith Press for the International Child Neurology Association.
17. Curatolo P., Porfirio M.C., Manzi B., and Seri S., *Autism in tuberous sclerosis.* European Journal of Paediatric Neurology, 2004. **8**(6): p. 327-332.
18. Curatolo P., Bombardieri R., and Jozwiak S., *Tuberous sclerosis.* Lancet, 2008. **372**(9639): p. 657-668.
19. Dabora S.L., Jozwiak S., Franz D.N., Roberts P.S., Nieto A., Chung J., Choy Y.S., Reeve M.P., Thiele E., Egelhoff J.C., Kasprzyk-Obara J., Domanska-Pakiela D., and Kwiatkowski D.J., *Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2,*



- compared with *TSC1*, disease in multiple organs. *American Journal of Human Genetics*, 2001. **68**(1): p. 64-80.
20. Davies D.M., de Vries P.J., Johnson S.R., McCartney D.L., Cox J.A., Serra A.L., Watson P.C., Howe C.J., Doyle T., and Pointon K., *Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis: a phase 2 trial*. *Clinical Cancer Research*, 2011. **17**(12): p. 4071-4081.
  21. Davies P.A. and Gray G., *Long-range PCR, in PCR Mutation Detection Protocols*. 2002: Springer. 51-55.
  22. Davoren P. and Epstein M., *Insulinoma complicating tuberous sclerosis*. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 1992. **55**(12): p. 1209.
  23. Den Dunnen J.T. and Antonarakis S.E., *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion*. *Human Mutation*, 2000. **15**(1): p. 7-12.
  24. Dixon B.P., Hulbert J.C., and Bissler J.J., *Tuberous sclerosis complex renal disease*. *Nephron. Experimental Nephrology*, 2010. **118**(1): p. e15.
  25. Eussen B.H., Bartalini G., Bakker L., Balestri P., Di Lucca C., Van Hemel J.O., Dauwerse H., van Den Ouweland A.M., Ris-Stalpers C., Verhoef S., Halley D.J., and Fois A., *An unbalanced submicroscopic translocation t(8;16)(q24.3;p13.3)pat associated with tuberous sclerosis complex, adult polycystic kidney disease, and hypomelanosis of Ito*. *J Med Genet*, 2000. **37**(4): p. 287-291.
  26. Fischer S.G. and Lerman L.S., *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(6): p. 1579-1583.
  27. Fitzpatrick T.B., *History and significance of white macules, earliest visible sign of tuberous sclerosis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1991. **615**(1): p. 26-35.
  28. Franz D.N., Leonard J., Tudor C., Chuck G., Care M., Sethuraman G., Dinopoulos A., Thomas G., and Crone K.R., *Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex*. *Annals of Neurology*, 2006. **59**(3): p. 490-498.
  29. Franz D.N., Belousova E., Sparagana S., Bebin E.M., Frost M., Kuperman R., Witt O., Kohrman M.H., Flamini J.R., and Wu J.Y., *Efficacy and safety of everolimus for subependymal giant cell astrocytomas associated with tuberous sclerosis complex (EXIST-1): a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 trial*. *The lancet*, 2013. **381**(9861): p. 125-132.
  30. Fryer A., Connor J., Povey S., Yates J., Chalmers A., Fraser I., Yates A., and Osborne J., *Evidence that the gene for tuberous sclerosis is on chromosome 9*. *The lancet*, 1987. **329**(8534): p. 659-661.
  31. Gao X., Zhang Y., Arrazola P., Hino O., Kobayashi T., Yeung R.S., Ru B., and Pan D., *Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling*. *Nature Cell Biology*, 2002. **4**(9): p. 699-704.
  32. Goh S., Butler W., and Thiele E.A., *Subependymal giant cell tumors in tuberous sclerosis complex*. *Neurology*, 2004. **63**(8): p. 1457-1461.
  33. Haemel A.K., O'Brian A.L., and Teng J.M., *Topical rapamycin: a novel approach to facial angiofibromas in tuberous sclerosis*. *Archives of Dermatology*, 2010. **146**(7): p. 715-718.
  34. Hass J., Mayer K., and Rott H.D., *Tuberous sclerosis type 1: three novel mutations detected in exon 15 by a combination of HDA and TGGE*. *Human Mutation*, 2000. **16**(1): p. 88.
  35. Hempel M., Haack T., Eck S., and Prokisch H., *Next generation sequencing*. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 2011. **159**(9): p. 827-833.
  36. Henske E.P. and McCormack F.X., *Lymphangiomyomatosis—a wolf in sheep's clothing*. *The Journal of clinical investigation*, 2012. **122**(11): p. 3807.
  37. Hestekin C.N. and Barron A.E., *The potential of electrophoretic mobility shift assays for clinical mutation detection*. *Electrophoresis*, 2006. **27**(19): p. 3805-3815.
  38. Hung C.-C., Su Y.-N., Chien S.-C., Liou H.-H., Chen C.-C., Chen P.-C., Hsieh C.-J., Chen C.-P., Lee W.-T., and Lin W.-L., *Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex*. *BMC Medical Genetics*, 2006. **7**(1): p. 72.

39. Inoki K., Li Y., Zhu T., Wu J., and Guan K.-L., *TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling*. Nature Cell Biology, 2002. **4**(9): p. 648-657.
40. Jansen F., Vincken K., Algra A., Anbeek P., Braams O., Nellist M., Zonnenberg B., Jennekens-Schinkel A., van den Ouweland A., and Halley D., *Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition*. Neurology, 2008. **70**(12): p. 916-923.
41. Jiang T., Jia G., Ma Z., Luo S., and Zhang Y., *The diagnosis and treatment of subependymal giant cell astrocytoma combined with tuberous sclerosis*. Child's Nervous System, 2011. **27**(1): p. 55-62.
42. Johnson S., Cordier J., Lazor R., Cottin V., Costabel U., Harari S., Reynaud-Gaubert M., Boehler A., Brauner M., and Popper H., *European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangiomyomatosis*. European Respiratory Journal, 2010. **35**(1): p. 14-26.
43. Kandt R., Haines J., Smith M., Northrup H., Gardner R., Short M., Dumars K., Roach E., Steingold S., and Wall S., *Linkage of an important gene locus for tuberous sclerosis to a chromosome 16 marker for polycystic kidney disease*. Nature Genetics, 1992. **2**(1): p. 37-41.
44. Kaufman McNamara E., Curtis A.R., and Fleischer Jr A.B., *Successful treatment of angiofibromata of tuberous sclerosis complex with rapamycin*. Journal of Dermatological Treatment, 2012. **23**(1): p. 46-48.
45. Kenerson H., Dundon T.A., and Yeung R.S., *Effects of rapamycin in the Eker rat model of tuberous sclerosis complex*. Pediatric Research, 2005. **57**(1): p. 67-75.
46. Kingswood J.C., Bruzzi P., Curatolo P., de Vries P.J., Fladrowski C., Hertzberg C., Jansen A.C., Jozwiak S., Nabbout R., and Sauter M., *TOSCA-first international registry to address knowledge gaps in the natural history and management of tuberous sclerosis complex*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2014. **9**(1): p. 1-9.
47. Knudson A.G., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1971. **68**(4): p. 820-823.
48. Kothare S.V., Singh K., Chalifoux J.R., Staley B.A., Weiner H.L., Menzer K., and Devinsky O., *Severity of manifestations in tuberous sclerosis complex in relation to genotype*. Epilepsia, 2014. **55**(7): p. 1025-1029.
49. Kozlowski P., Roberts P., Dabora S., Franz D., Bissler J., Northrup H., Au K.S., Lazarus R., Domanska-Pakiela D., and Kotulska K., *Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations*. Human Genetics, 2007. **121**(3-4): p. 389-400.
50. Krueger D.A., Care M.M., Holland K., Agricola K., Tudor C., Mangeshkar P., Wilson K.A., Byars A., Sahmoud T., and Franz D.N., *Everolimus for subependymal giant-cell astrocytomas in tuberous sclerosis*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(19): p. 1801-1811.
51. Krueger D.A., Northrup H., and Group I.T.S.C.C., *Tuberous sclerosis complex surveillance and management: recommendations of the 2012 international tuberous sclerosis complex consensus conference*. Pediatric Neurology, 2013. **49**(4): p. 255-265.
52. Kwiatkowska J., Wigowska-Sowinska J., Napierala D., Slomski R., and Kwiatkowski D.J., *Mosaicism in tuberous sclerosis as a potential cause of the failure of molecular diagnosis*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(9): p. 703-707.
53. Kwiatkowski D.J., Zhang H., Bandura J.L., Heiberger K.M., Glogauer M., el-Hashemite N., and Onda H., *A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas, and up-regulation of p70S6 kinase activity in Tsc1 null cells*. Human Molecular Genetics, 2002. **11**(5): p. 525-534.
54. Kwiatkowski D.J., Whitemore V.H., and Thiele E.A., *Tuberous sclerosis complex: genes, clinical features and therapeutics*. 2011: John Wiley & Sons.
55. Lendvai T.S. and Marshall F.F., *The tuberous sclerosis complex and its highly variable manifestations*. The Journal of urology, 2003. **169**(5): p. 1635-1642.

56. Levine D., Barnes P., Korf B., and Edelman R., *Tuberous sclerosis in the fetus: second-trimester diagnosis of subependymal tubers with ultrafast MR imaging*. American Journal of Roentgenology, 2000. **175**(4): p. 1067-1069.
57. Levsky J.M. and Singer R.H., *Fluorescence in situ hybridization: past, present and future*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 14): p. 2833-2838.
58. Löffler G., Petrides P.E., and Heinrich P.C., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2007: Springer Science & Business.
59. Longa L., Saluto A., Brusco A., Polidoro S., Padovan S., Allavena A., Carbonara C., Grosso E., and Migone N., *TSC1 and TSC2 deletions differ in size, preference for recombinatorial sequences, and location within the gene*. Human Genetics, 2001. **108**(2): p. 156-166.
60. Maheshwar M.M., Cheadle J.P., Jones A.C., Myring J., Fryer A.E., Harris P.C., and Sampson J.R., *The GAP-related domain of tuberlin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis*. Human Molecular Genetics, 1997. **6**(11): p. 1991-1996.
61. Mayer K., Ballhausen W., and Rott H.D., *Mutation screening of the entire coding regions of the TSC1 and the TSC2 gene with the protein truncation test (PTT) identifies frequent splicing defects*. Human Mutation, 1999. **14**(5): p. 401-411.
62. Mayer K., Ballhausen W., Leistner W., and Rott H.-D., *Three novel types of splicing aberrations in the tuberous sclerosis TSC2 gene caused by mutations apart from splice consensus sequences*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2000. **1502**(3): p. 495-507.
63. Mayer K., Fonatsch C., Wimmer K., van den Ouweland A.M., and Maat-Kievit A.J., *Clinical utility gene card for: Tuberous sclerosis complex (TSC1, TSC2)*. European Journal of Human Genetics, 2014. **22**(2).
64. McCormack F.X., Inoue Y., Moss J., Singer L.G., Strange C., Nakata K., Barker A.F., Chapman J.T., Brantly M.L., and Stocks J.M., *Efficacy and safety of sirolimus in lymphangioliomyomatosis*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(17): p. 1595-1606.
65. Moavero R., Coniglio A., Garaci F., and Curatolo P., *Is mTOR inhibition a systemic treatment for tuberous sclerosis?* Italian Journal of Pediatrics, 2013. **39**: p. 57.
66. Nakhleh R.E., *Angiomyolipoma of the liver*. Pathology Case Reviews, 2009. **14**(1): p. 47-49.
67. Napolioni V. and Curatolo P., *Genetics and molecular biology of tuberous sclerosis complex*. Curr Genomics, 2008. **9**(7): p. 475-487.
68. Nellist M., Sancak O., Goedbloed M., Veghel-Plandsoen M.V., Maat-Kievit A., Lindhout D., Eussen B., De Klein A., Halley D., and Ouweland A.V.D., *Large deletion at the TSC1 locus in a family with tuberous sclerosis complex*. Genetic testing, 2005. **9**(3): p. 226-230.
69. Neurohr C., Hoffmann A.L., Huppmann P., Herrera V.A., Ihle F., Leuschner S., von Wulffen W., Meis T., Baezner C., and Leuchte H., *Is sirolimus a therapeutic option for patients with progressive pulmonary lymphangioliomyomatosis*. Respiratory Research, 2011. **12**: p. 66.
70. Northrup H., Kwiatkowski D., Roach E., Dobyns W.B., Lewis R., Herman G., Rodriguez Jr E., Daiger S., and Blanton S., *Evidence for genetic heterogeneity in tuberous sclerosis: one locus on chromosome 9 and at least one locus elsewhere*. American Journal of Human Genetics, 1992. **51**(4): p. 709.
71. Northrup H., Koenig M.K., and Au K.-S., *Tuberous sclerosis complex*. 2011.
72. Northrup H. and Krueger D.A., *Tuberous sclerosis complex diagnostic criteria update: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference*. Pediatric Neurology, 2013. **49**(4): p. 243-254.
73. O'Callaghan F.J., Noakes M.J., Martyn C.N., and Osborne J.P., *An epidemiological study of renal pathology in tuberous sclerosis complex*. BJU International, 2004. **94**(6): p. 853-857.
74. O'Donovan M.C., Oefner P.J., Roberts S.C., Austin J., Hoogendoorn B., Guy C., Speight G., Upadhyaya M., Sommer S.S., and McGuffin P., *Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection*. Genomics, 1998. **52**(1): p. 44-49.
75. Orlova K.A. and Crino P.B., *The tuberous sclerosis complex*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1184**(1): p. 87-105.

76. Osborne J.P., Fryer A., and Webb D., *Epidemiology of tuberous sclerosis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1991. **615**: p. 125-127.
77. Pringle J., *A case of congenital adenoma sebaceum*. British Journal of Dermatology, 1890. **2**(1).
78. Pymar L.S., Platt F.M., Askham J.M., Morrison E.E., and Knowles M.A., *Bladder tumour-derived somatic TSC1 missense mutations cause loss of function via distinct mechanisms*. Human Molecular Genetics, 2008. **17**(13): p. 2006-2017.
79. Qin W., Kozlowski P., Taillon B.E., Bouffard P., Holmes A.J., Janne P., Camposano S., Thiele E., Franz D., and Kwiatkowski D.J., *Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex*. Human Genetics, 2010. **127**(5): p. 573-582.
80. Rakowski S., Winterkorn E., Paul E., Steele D., Halpern E., and Thiele E., *Renal manifestations of tuberous sclerosis complex: incidence, prognosis, and predictive factors*. Kidney International, 2006. **70**(10): p. 1777-1782.
81. Ridler K., Bullmore E., De Vries P., Suckling J., Barker G., Meara S., Williams S., and Bolton P., *Widespread anatomical abnormalities of grey and white matter structure in tuberous sclerosis*. Psychological Medicine, 2001. **31**(08): p. 1437-1446.
82. Rivers J.K., MacLennan R., Kelly J.W., Lewis A.E., Tate B.J., Harrison S., and McCarthy W.H., *The eastern Australian childhood nevus study: prevalence of atypical nevi, congenital nevus-like nevi, and other pigmented lesions*. Journal of the American Academy of Dermatology, 1995. **32**(6): p. 957-963.
83. Roach E., Gomez M.R., and Northrup H., *Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria*. Journal of Child Neurology, 1998. **13**(12): p. 624-628.
84. Roach E.S., Gomez M.R., and Northrup H., *Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria*. Journal of Child Neurology, 1998. **13**(12): p. 624-628.
85. Roach E.S. and Sparagana S.P., *Diagnosis of tuberous sclerosis complex*. Journal of Child Neurology, 2004. **19**(9): p. 643-649.
86. Roberts P., Jozwiak S., Kwiatkowski D., and Dabora S., *Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) is a highly sensitive, semi-automated method for identifying mutations in the TSC1 gene*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2001. **47**(1): p. 33-37.
87. Robertson D.M., *Ophthalmic manifestations of tuberous sclerosis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1991. **615**(1): p. 17-25.
88. Rok P., Kasprzyk-Obara J., Domańska-Pakieła D., and Józwiak S., *Clinical symptoms of tuberous sclerosis complex in patients with an identical TSC2 mutation*. Medical Science Monitor, 2005. **11**(5): p. CR230-CR234.
89. Rott H.-D. and Hehn H., *Tuberöse Sklerose: Eine Krankheit, die (auch) unter die Haut geht*. 2007: Verlag-und Werbebes. f. polit. Meinungsbildung.
90. Ryther R.C. and Wong M., *Mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibition: potential for antiseizure, antiepileptogenic, and epileptostatic therapy*. Current Neurology and Neuroscience Reports, 2012. **12**(4): p. 410-418.
91. Sampson J., *TSC1 and TSC2: genes that are mutated in the human genetic disorder tuberous sclerosis*. Biochemical Society Transactions, 2003. **31**(3): p. 592-596.
92. Sampson J.R., Maheshwar M.M., Aspinwall R., Thompson P., Cheadle J.P., Ravine D., Roy S., Haan E., Bernstein J., and Harris P.C., *Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene*. The American Journal of Human Genetics, 1997. **61**(4): p. 843-851.
93. Sancak O., Nellist M., Goedbloed M., Elfferich P., Wouters C., Maat-Kievit A., Zonnenberg B., Verhoef S., Halley D., and van den Ouweland A., *Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex*. European Journal of Human Genetics, 2005. **13**(6): p. 731-741.
94. Schouten J.P., McElgunn C.J., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., and Pals G., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(12): p. e57-e57.

95. Schwartz R.A., Fernández G., Kotulska K., and Jóźwiak S., *Tuberous sclerosis complex: advances in diagnosis, genetics, and management*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **57**(2): p. 189-202.
96. Shepherd C.W., GOMEZ M.R., Lie J., and CROWSON C.S. *Causes of death in patients with tuberous sclerosis*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 1991: Elsevier.
97. Southern E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. 1975. Biotechnology, 1992. **24**: p. 122-139.
98. Taveira-DaSilva A.M., Hathaway O., Stylianou M., and Moss J., *Changes in lung function and chylous effusions in patients with lymphangioleiomyomatosis treated with sirolimus*. Annals of Internal Medicine, 2011. **154**(12): p. 797-805.
99. Tee A.R., Fingar D.C., Manning B.D., Kwiatkowski D.J., Cantley L.C., and Blenis J., *Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(21): p. 13571-13576.
100. Tee A.R., Manning B.D., Roux P.P., Cantley L.C., and Blenis J., *Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb*. Current Biology, 2003. **13**(15): p. 1259-1268.
101. van Eeghen A.M., Black M.E., Pulsifer M.B., Kwiatkowski D.J., and Thiele E.A., *Genotype and cognitive phenotype of patients with tuberous sclerosis complex*. European Journal of Human Genetics, 2012. **20**(5): p. 510-515.
102. van Slegtenhorst M., de Hoogt R., Hermans C., Nellist M., Janssen B., Verhoef S., Lindhout D., Van den Ouweland A., Halley D., and Young J., *Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34*. Science, 1997. **277**(5327): p. 805-808.
103. Verhoef S., Bakker L., Tempelaars A.M., Hesselink-Janssen A.L., Mazurczak T., Jozwiak S., Fois A., Bartalini G., Zonnenberg B.A., and van Essen A.J., *High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex*. The American Journal of Human Genetics, 1999. **64**(6): p. 1632-1637.
104. Verhoef S., Bakker L., Tempelaars A.M., Hesselink-Janssen A.L., Mazurczak T., Jozwiak S., Fois A., Bartalini G., Zonnenberg B.A., van Essen A.J., Lindhout D., Halley D.J., and van den Ouweland A.M., *High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(6): p. 1632-1637.
105. Vogt P., *Zur Pathologie und pathologischen Anatomie der verschiedenen Idiotieformen*. pp. 130–150. European Neurology, 1908. **24**(2): p. 130-150.
106. Waggott W., *Long Range PCR*, in *Clinical Applications of PCR*. 1998: Springer. 81-91.
107. Ward P. and McCarthy D., *Periungual fibroma*. Cutis, 1990. **46**(2): p. 118-124.
108. Washecka R. and Hanna M., *Malignant renal tumors intuberous sclerosis*. Urology, 1991. **37**(4): p. 340-343.
109. Webb D., Carke A., Fyer A., and Osborne J., *The cutaneous features of tuberous sclerosis: a population study*. British Journal of Dermatology, 1996. **135**(1): p. 1-5.
110. Winterkorn E.B., Pulsifer M.B., and Thiele E.A., *Cognitive prognosis of patients with tuberous sclerosis complex*. Neurology, 2007. **68**(1): p. 62-64.
111. Yeung R.S., *Multiple roles of the tuberous sclerosis complex genes*. Genes, Chromosomes and Cancer, 2003. **38**(4): p. 368-375.
112. Yu J., Astrinidis A., Howard S., and Henske E.P., *Estradiol and tamoxifen stimulate LAM-associated angiomyolipoma cell growth and activate both genomic and nongenomic signaling pathways*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004. **286**(4): p. L694-L700.

## 11 DANKSAGUNG

Zu Letzt gilt nun mein Dank all denen, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Walther für die Überlassung des Themas sowie für seine Unterstützung, die große Geduld und die wertvollen Ratschläge bedanken. Ein besonders herzlicher Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Karin Mayer für die vielen, mühevoll zusammengetragenen Datensätze als Grundgerüst dieser Arbeit, aber vor allem für ihre Unterstützung, gute Beratung und Geduld. Ich durfte während dieser Zeit sehr viel von ihr lernen.

In meinem persönlichen Umfeld möchte ich meinem Freund Max für die großartige Unterstützung danken. Und ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die meine Ausbildung nach Kräften und mit viel Liebe unterstützt und mir das Medizinstudium ermöglicht haben.

Herzlichen Dank!