

Esclerosis Tuberosa: patogénesis molecular y modelos animales



DR. LEANDRO PIEDIMONTE

*Division of Pediatric Neurosurgery,
Department of Neurosurgery,
NYU Medical Center
New York, USA*

Resumen

Mutaciones en uno de dos genes, TSC1 o TSC2, dan como resultado una enfermedad de similar fenotipo al interrumpir la interacción normal de sus productos proteicos, hamartina y tuberina, los cuales forman un complejo funcional de señales intracelulares. La disrupción de estos genes en el cerebro da resultado a diferenciación, proliferación, y migración celular anormal, dando origen a las lesiones cerebrales características del complejo de esclerosis tuberosa llamadas, tuberosidades corticales. Las complicaciones más devastadoras del complejo de la esclerosis tuberosa afectan al sistema nervioso central e incluyen epilepsia, retardo mental, autismo, y tumores gliales. Modelos animales relevantes, como los ratones knocked out son herramientas valiosas para el estudio de las funciones normales de la hamartina y la tuberina y de cómo la disrupción de su expresión da origen a la variedad de rasgos clínicos que caracterizan al complejo de esclerosis tuberosa. En el futuro, estos animales van a ser modelos preclínicos muy valiosos para el desarrollo de tratamientos altamente específicos y eficaces para los chicos afectados con el complejo de esclerosis tuberosa.

Introducción

El complejo de esclerosis tuberosa es un síndrome autonómico dominante de predisposición tumoral que afecta a 1 de cada 7.500 individuos en el todo mundo.¹⁹ El complejo de esclerosis tuberosa es caracterizado por el crecimiento de formaciones hamartomasas benignas en múltiples órganos, incluyendo riñones piel, retina, pulmones y cerebro. Raramente pueden desarrollarse tumores malignos como el carcinoma de células renales. Aunque ya ha pasado casi una década desde los primeros estudios que revelaron los dos loci genéticos

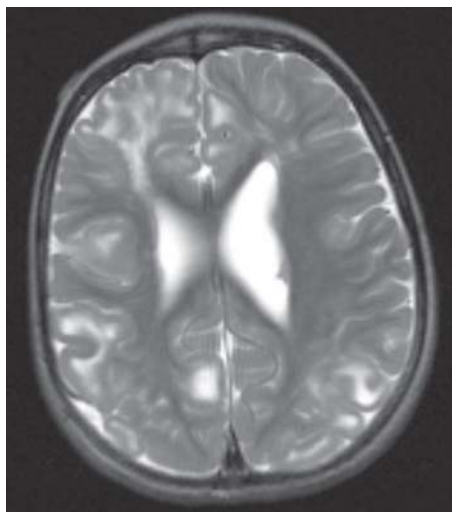
asociados con el complejo de esclerosis tuberosa, aun permanece pobremente comprendido el mecanismo por el cual la disrupción de estos genes produce las anormalidades asociadas. Esfuerzos actuales orientados al desarrollo de modelos animales preclínicos han provisto de importantes conocimientos a cerca de la patogénesis del complejo de esclerosis tuberosa y continuaran sirviendo como una útil herramienta para el estudio de terapias clínicas potenciales.

Manifestaciones neurológicas y lesiones cerebrales

Clínicamente, las tuberosidades corticales, lesiones patognomónicas de la enfermedad, causan complicaciones en el sistema nervioso central extremadamente discapacitantes que caracterizan al complejo de esclerosis tuberosa. Habitualmente, las tuberosidades son detectadas en RMN como señales de alta intensidad en secuencia T2 que están usualmente localizadas en la unión entre la sustancia blanca y la sustancia gris (figura 1). Se ha sugerido que el tamaño y la ubicación de las tuberosidades corticales se correlacionan con las manifestaciones más importantes del sistema nervioso central: epilepsia, retardo mental, y autismo^{1,51}. El número y la ubicación de las tuberosidades corticales y la edad al comienzo de las crisis epilépticas están altamente relacionados con la evolución clínica.^{1,30}

Las crisis epilépticas ocurren en aproximadamente el 80% de los individuos afectados. Los infantes afectados con el complejo de esclerosis tuberosa comúnmente se presentan con crisis parciales motoras o espasmos infantiles durante el primer año de vida⁹. Es común durante la niñez temprana un incremento en la frecuencia y en la severidad de las

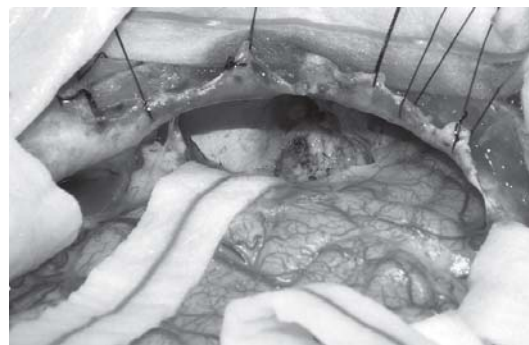
Figura 1. Resonancia magnética axial prequirúrgica en secuencia T2 demostrando múltiples hiperintensidades subcorticales bilaterales (más abundantes en el hemisferio derecho) que representan tuberosidades.



convulsiones. Con la madurez, los espasmos infantiles asociados al complejo de esclerosis tuberosa frecuentemente evolucionan hacia otro tipo de convulsiones como motoras parciales, parciales complejas, y secundariamente generalizadas.⁸ Los focos epileptogénicos identificados por electroencefalografía se correlacionan frecuentemente con las tuberosidades corticales visualizadas con imágenes de resonancia magnética^{9, 20}. La progresión de espasmos infantiles a otro tipo de convulsiones podría reflejar la formación de tuberosidades en diferentes periodos durante el proceso de desarrollo cortical. Por lo tanto, las tuberosidades localizadas en áreas que han adquirido madurez funcional más tempranamente se pueden volver epileptogénicas antes que tuberosidades localizadas en regiones del cerebro que maduran más lentamente.⁸ Finalmente, debido a la edad prematura de estos pacientes, los médicos no pueden visualizar precisamente cada una de estas lesiones, haciendo por lo tanto extremadamente difícil de predecir la progresión de la epilepsia en estos pacientes.

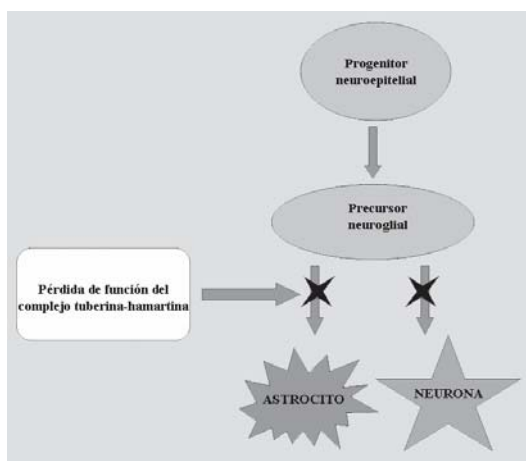
Las convulsiones asociadas al complejo de esclerosis tuberosa son generalmente refractarias a las terapias farmacológicas convencionales. En algunos pacientes con esclerosis tuberosa se ha logrado un incremento del control de las convulsiones usando el agonistas del ácido α -amino butírico.²³ La epilepsia es prominente tanto en pacientes pediátricos como en los adultos y típicamente requiere tratamientos de largo plazo con agentes antiepilépticos. El control adecuado es raramente obtenido y muchos pacientes requieren cirugía de epilepsia a pesar de la poli terapia con drogas antiepilépticas (figura 2). La resección quirúrgica de las tuberosidades puede ser beneficiosa pero muchos pacientes continúan sufriendo convulsiones posquirúrgicas.⁶⁵ Las evidencias patológicas sugieren que las tuberosidades corticales representan áreas de diferenciación y migración anormal. De todos modos, debido a que las áreas de la corteza que rodean a las tuberosidades no están alteradas y a que las tuberosidades usualmente alteran la laminación cortical normal, una hipótesis sugiere que las tuberosidades son el resultado

Figura 2. Imagen intraoperatoria luego de la resección completa de una tuberosidad subcortical.



de procesos de diferenciación, migración y proliferación anormales de una subpoblación de células precursoras. (Figura 3).

Figura 3. La diferenciación celular en el sistema nervioso central es alterada por la inactivación del complejo tuberina-hamartina. Durante el periodo de desarrollo, las neuronas y los astrocitos, se originan a partir de precursores neurogliales. Las «Células Gigantes» que expresan una variedad de marcadores celulares incluyendo aquellos característicos de células de sistemas nerviosos inmaduros, son encontradas en las lesiones del sistema nervioso central relacionadas al complejo de esclerosis tuberosa. Esto mismo sugiere que la inactivación del complejo tuberina-hamartina interfiere con la maduración normal de las células precursoras y compromete su maduración hacia neuronas y astrocitos más diferenciados. Estrella negra: Inactivación del complejo Tuberina-Hamartina.



Las tuberósidades contienen neuronas dismórficas, un número incrementado de astrocitos y las características «células gigantes». El origen celular de estas células gigantes es desconocido, aunque posiblemente las mismas deriven de una célula precursora neuroglial ya que frecuentemente estas células gigantes expresan proteínas maduras astrocíticas y neuronales. Muchas células gigantes también expresan proteínas inmaduras del sistema nervioso central, incluyendo nestina y vimentina.^{6,35} Similarmente, la morfología de las células gigantes es variable.⁴⁰ Evidencias recientes sugieren que las células de las tuberósidades corticales pueden experimentar procesos de proliferación activa, y que a pesar de su formación temprana, estas lesiones pueden ser más activas de lo que previamente se consideraba.³⁵ Además de las tuberósidades corticales, los individuos afectados con el complejo de esclerosis tuberosa desarrollan neoplasias astrocíticas de bajo grado. Los nódulos subependimales son lesiones proliferativas benignas que se observan en la superficie de los ventrículos laterales. A diferencia de las tuberósidades corticales, estas lesiones suelen ser asintomáticas pero pueden evolucionar a astrocitomas subependimales de células gigantes.

Aunque no son francamente malignos, los astrocitomas subependimales de células gigantes pueden causar obstrucción ventricular e hidrocefalia, situación que requiere intervención neuroquirúrgica.⁵² Además de células gliales, los nódulos subependimales y los astrocitomas subependimales de células gigantes, pueden contener células gigantes. Se piensa que estas lesiones, al igual que las tuberósidades corticales, se desarrollan en los primeros estadios de la vida y han sido identificadas en la semana 27 de gestación.³⁸ Se cree que estas lesiones, de igual manera que las tuberósidades, provienen del desarrollo anormal de células precursoras durante el desarrollo cerebral.

Genética y patogénesis molecular

Estudios genéticos han identificado dos loci diferentes que sufren inactivación mutacional en individuos que padecen el complejo de esclerosis tuberosa.⁴⁸ La expresión fenotípica del complejo de esclerosis tuberosa se manifiesta cuando ocurre alguna mutación en uno de dos genes, TSC1 o TSC2. El gen TSC1 está localizado en el cromosoma 9q43. El gen contiene 23 exones y codifica para la proteína de 23 kDa hamartina.⁵⁹ Esta proteína tiene muy escasa homología de secuencia con otras proteínas conocidas. El gen TSC2 se encuentra ubicado en el cromosoma 16p13 y codifica para la proteína de 180 a 200 kDa, tuberina. La tuberina contiene una pequeña región con similaridad secuencial a proteínas con función de proteína activadora de guanosina trifosfatasa. Las proteínas activadoras de guanosina trifosfatasa son moléculas que regulan negativamente a pequeñas proteínas guanosina trifosfatasa relacionadas con el oncogen Ras. Estas moléculas relacionadas al Ras son activas unidas a guanosina trifosfato y se inactivan por la conversión de guanosina trifosfato a guanosina difosfato, por medio de la acción de la guanosina trifosfatasa. Las proteínas con actividad de guanosina trifosfatasa aceleran la conversión de la forma activa guanosina trifosfato a la forma inactiva guanosina difosfato por medio de la activación de la guanosina trifosfatasa, de Ras y proteínas relacionadas.

Ambas, hamartina y tuberina contienen dominios que actúan como mediadores de su interacción para formar el complejo proteico tuberina-hamartina.^{45, 60} La formación de este complejo es crucial para el funcionamiento de la tuberina y la hamartina, y las mutaciones asociadas al complejo de esclerosis tuberosa frecuentemente alteran esta interacción, dando lugar a un complejo tuberina-hamartina funcionalmente inactivo. Entre las mutaciones identificadas del gen TSC se incluyen mutaciones missense, sin sentido, y deleciones en marco y extensas.^{25, 34} Los casos familiares del complejo de esclerosis tuberosa tienen una distribución aproximadamente igual de familias con mutaciones en

los genes TSC1 y TSC2, mientras que las mutaciones en el gen TSC2 son aproximadamente cuatro veces más comunes en los casos esporádicos.^{4, 34} Debido a que dos tercios de los pacientes con el complejo de esclerosis tuberosa tienen mutaciones esporádicas, la alta frecuencia en la mutación de TSC2, podría estar reflejando una mayor capacidad intrínseca de mutación del gen TSC2.

Los individuos nacidos con una copia mutada de los genes TSC1 o TSC2 en todas las células del cuerpo, están predispuestos a desarrollar tumores en numerosos órganos, lo cual sugiere que estos genes actúan como supresores tumorales. La actividad tumoral se inicia en estos individuos cuando una o más células somáticas sufren una segunda mutación («segundo golpe») y el gen TSC restante es inactivado. Esta pérdida en la expresión de TSC1 o TSC2 tiene como consecuencia un crecimiento y proliferación celular anormal. De hecho, hamartomas provenientes de pacientes con ambas formas de enfermedad, familiar y esporádica, han evidenciado la ausencia de la copia normal de TSC1 y TSC2 o pérdida de heterocigocidad, indicando que estos genes actúan como clásicos supresores tumorales.^{24,51,59} Estudios *In vitro* han sustentado el rol de estos genes como supresores tumorales. Cuando tanto la tuberina como la hamartina están sobreexpresadas en cultivos celulares, el crecimiento celular es interrumpido.^{2, 37} De forma similar, la regulación negativa en la expresión de TSC2 en fibroblastos cultivados resultó en un incremento en la proliferación celular.⁵⁴

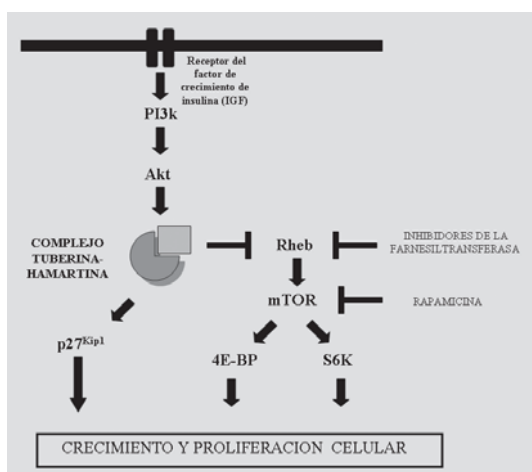
La tuberina y la hamartina están altamente expresadas en el sistema nervioso de humanos y ratones tanto en las neuronas como en las células gliales.^{21,39} La tuberina y la hamartina son aparentemente requeridas para el desarrollo del sistema nervioso central, y la tuberina podría ser esencial para el proceso de diferenciación neuronal.⁵³ Es probable que estas proteínas tengan en el sistema nervioso central un efecto similar al que poseen en otros órganos, actuando como supresores tumorales.

Esta hipótesis surge debido a que la expresión de tuberina está reducida o ausente en el 30% de los astrocitomas esporádicos.⁶¹ Existe evidencia controvertida sobre si las mutaciones somáticas en los alelos normales TSC1 y TSC2 son un requerimiento para la formación de tuberosidades corticales en pacientes que poseen solo una copia normal de uno de los dos genes TSC.^{24,41,49} Debido a que estas lesiones están compuestas por muchos tipos celulares diferentes, puede ser dificultoso identificar el subgrupo de células que han sufrido un segundo evento mutacional. Como sustento de la hipótesis de que dos golpes genéticos son requeridos para la formación de tuberosidades asociadas al complejo de esclerosis tuberosa, evidencias recientes sugieren que, en ratones, progenitores de células neuroepiteliales que carecen de la expresión de TSC2 poseen muchos rasgos de las células gigantes encontradas en las tuberosidades corticales.⁴²

Los dos fenotipos celulares anormales implican un incremento tanto en la proliferación como en el crecimiento celular. Los conocimientos respecto a como el complejo tuberina-hamartina podría regular estos procesos surgieron originalmente de experimentos con *Drosophila*. Cuando los homólogos de TSC1 y TSC2 fueron mutados en moscas, los procesos de organogénesis procedieron normalmente, pero fueron observados drásticos incrementos en el tamaño de los órganos.^{28, 46} Estos defectos en tamaño fueron atribuidos a ambos, un incremento en la proliferación celular determinado por la medición del número de células mitóticas, y a un incremento en el tamaño celular individual al ser mutado TSC1.⁴⁶ La sobreexpresión de ambos, TSC1 y TSC2 en estas moscas, revirtió estos defectos. Debido a que la vía de señal molecular de la insulina ha sido vinculada al crecimiento y la proliferación celular,⁵⁶ la posibilidad de que el complejo tuberina-hamartina pudiese regular esta vía molecular, resulta factible. Como soporte de esta hipótesis, la sobreexpresión de TSC1 y TSC2 rescato de la letalidad a mutantes de *Drosophila* en los cuales el receptor de insulina era no funcional y también revirtió los defectos proliferativos en moscas que sobre expresaron el receptor de insulina.^{15,26,46}

Estudios adicionales, primero en *drosophila* y luego en células de mamíferos indicaron que el complejo tuberina-hamartina funciona en la vía molecular del factor de crecimiento tipo insulina en eventos moleculares que suceden a la actividad de fosfatidil inositol-3 kinasa y Akt. (figura 4). Esta vía molecular es identificada como responsable de la proliferación y el tamaño celular. Cuando el receptor de insulina es activado, fosfatidil inositol-3 kinasa es reclutado hacia la membrana y desencadena la producción y liberación del segundo mensajero fosfatidil inositol 3-4-5 trifosfato. Akt, una serina/treonina kinasa, es activada por inositol 3-4-5 trifosfato. Ha sido evidenciado que Akt fosforila a la tuberina, dando como resultado su disociación de la hamartina e inactivación del complejo tuberina-hamartina.^{11,47} El complejo funcional tuberina-hamartina, inhibe la actividad de mTor (mammalian target of rapamycin).^{16,27,42,57} De todos modos, cuando el complejo tuberina-hamartina es inactivado por la fosforilación de tuberina mediada por Akt, la inhibición de mTor es liberada. La activación de mTor ha demostrado desencadenar la fosforilación de la kinasa S6 ribosomal y del factor 4E ligado a proteína 1.^{14,18} La activación de esas proteínas resulta en un incremento de la síntesis proteica y, en última instancia, del crecimiento celular. En células en las cuales el complejo tuberina-hamartina es permanentemente inactivado por una mutación genética, se encuentran constitutivamente presentes elevados niveles de de kinasa S6 fosforilada y factor 4E ligado a proteína. 1, resultando en un crecimiento celular desregulado. Varios grupos de investigación han demostrado que las células con mutaciones en TSC1 y TSC2 poseen niveles elevados de kinasa S6 fosforilada y factor 4E

Figura 4. Para aliviar la inhibición que el complejo tuberina-hamartina ejerce sobre el crecimiento y la proliferación celular, fosfatidilinositol -3 kinasa (PI3K) y Akt, son activados por la estimulación del receptor de crecimiento tipo insulina (IGF). Akt fosforila a la tuberina inactivando el complejo y dando como resultado un incremento en el tamaño y la proliferación celular. El complejo tuberina-hamartina regula negativamente a Rheb, una pequeña guanosina difosfatasa que activa la cascada de señalización mTOR/S6Kinasas(S6K)/factor 4E unido a proteína. (4E-BP), que es importante para la regulación del tamaño y la proliferación. Además, el complejo tuberina-hamartina puede regular la expresión del inhibidor de D kinasa p27^{Kip1}, involucrado en el control del crecimiento y el tamaño celular.



binding protein1, mientras que la sobreexpresión de TSC1 y TSC2 inhibe la hiperactivación de la vía S6 kinasa.^{27,33,42,57} La fosforilación de S6 kinasa, se encuentra también incrementada en células que expresan al gen TSC2 que contienen una mutación humana del gen TSC. 17.

El mecanismo por medio del cual el complejo tuberina-hamartina regula mTor, permaneció poco claro hasta que Rheb (Ras homologa enriched in brain), una guanosina trifosfatasa tipo Ras (GTPasa), fue identificada como el blanco de la actividad de la proteína activadora de tuberina guanosina trifosfatasa en *Drosophila*,^{17,64}. Rheb es requerida para la progresión del ciclo y el crecimiento celular en *Drosophila*.⁴⁴. En presencia del complejo tuberina-hamartina, la guanosina trifosfato unida a Rheb es hidrolizada a guanosina difosfato, resultando en la inactivación de Rheb. Cuando el complejo tuberina-hamartina es inactivado, tanto a través de la fosforilación de tuberina mediada por Akt, como por medio de mutación genética, Rheb se encuentra constitutivamente activo, teniendo esto como consecuencia una regulación positiva de las vías moleculares dependientes de mTor, y por ende un incremento en el tamaño celular. Por consiguiente, el aumento en la fosforilación de S6 kinasa en aquellas células en las que Rheb está sobreexpresado, puede ser bloqueado por medio del tratamiento con rapamicina, una droga que inhibe mTor.³

Aunque todas las funciones de Rheb en células de mamíferos no son totalmente comprendidas, es sabido que la farnesilación postraduccion de Rheb es requerida para la actividad de Rheb y la progresión del ciclo celular.⁵ De hecho, los inhibidores de la farnesiltransferasa que bloquean la activación postraduccion de Rheb, han demostrado inhibir la actividad de S6 kinasa dependiente de mTor.³ El mecanismo por medio del cual Rheb regula la actividad de mTor no es bien comprendido y es actualmente un área de investigación activa.

A demás de los efectos sobre el tamaño celular, la sobreexpresión de Rheb ha resultado en un incremento en la proliferación celular en *Drosophila*. 50, 55. De todos modos no es aun sabido si este efecto de Rheb es dependiente de mTor. En células de mamíferos, las kinasas dependientes de ciclinas son requeridas para el periodo de transición entre un estado de inactividad hacia uno de proliferación activa. Moléculas inhibitorias, tales como p27kip1, son responsables de la regulación de estas quinasas. La expresión del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas, p27kip1, esta reducida en aquellas células en las cuales la expresión de TSC1 o TSC2 es deficiente.^{53, 58} La tuberina puede regular la localización nuclear de p27kip1 debido a que esta molécula de encuentra erróneamente localizada en el citoplasma de fibroblastos deficientes en tuberina.⁵³ Más aun, la inactivación de p27kip1 en ratones es asociada con un aumento en el crecimiento y la proliferación celular.¹³ De todos modos no es claro aun si Rheb o mTor son requeridos para la regulación de la expresión de p27kip1.

Modelos animales

A pesar de que los avances en los estudios genéticos en *Drosophila* y los sistemas *In vivo*, contribuyeron al entendimiento de las actividades de señalización de estas proteínas, hoy existe un método más fidedigno aun. Esta técnica analiza los roles de señalización y desarrollo de la tuberina y la hamartina utilizando modelos de animales *In vivo*, de ambas formas, individualmente y como complejo proteico. Inicialmente los modelos animales fueron generados utilizando ratas Eker. Estos animales poseen una mutación espontánea de línea germinal en el gen homólogo al TSC2 del humano y han sido utilizados como modelo para el estudio del carcinoma hereditario de células renales.⁶³ Estos animales desarrollan tumores renales bilaterales y nódulos subependimales.⁶² Desafortunadamente, las manipulaciones genéticas en ratas han sido perjudicadas debido a la ausencia de métodos precisos para la generación de mutaciones específicas.²⁹ En contraste, métodos para generar ratones con cambios genéticos asociados a la enfermedad han sido bien establecidos y han sido ampliamente utilizados para estudiar la función de los genes supresores de tumores.³⁶ Los ratones transgénicos, no solo permiten el análisis de la disrupción y la

sobreexpresión de genes aislados, sino que también pueden ser cruzados para estudiar los efectos de cambios genéticos múltiples. De esta manera, estos ratones, producto de ingeniería genética, pueden servir como útiles modelos preclínicos para el estudio de la fisiopatología de la enfermedad y el desarrollo de terapias potenciales.

Los intentos iniciales para recapitular el fenotipo humano del complejo de esclerosis tuberosa en ratones fueron llevados a cabo utilizando ratones Knock-out convencionales en los cuales la expresión de línea germinal de TSC1 o TSC2 fue inactivada. Los ratones homocigotos para la pérdida de TSC1 o TSC2 mueren en la mitad del periodo embrionario debido a aparentes malformaciones cardíacas e hipoplasia hepática^{31,32,33}, mientras que los animales heterocigotos son viables pero desarrollan tumores renales y hepáticos. Los ratones TSC2 +/- desarrollan tumores a edades mas tempranas que los animales TSC1 +/- . Estos descubrimientos son interesantes ya que los pacientes que padecen mutaciones en TSC2 comúnmente desarrollan enfermedades mas severas que aquellos que poseen mutaciones en TSC1.¹⁰ En el sistema nervioso central de ratones TSC1 +/- y TSC2 +/- , el numero de astrocitos fue incrementado, sugiriendo esto que la hamartina y la tuberina son importantes reguladores del crecimiento astrocitario.⁵⁸ De todos modos, cuando crecieron In Vitro los astrocitos TSC2 +/- no demostraron una ventaja autónoma en el crecimiento celular. La expresión de la proteína asociada al ciclo celular p27kip1 se encontró reducida en los astrocitos TSC2 +/- en comparación con los astrocitos no mutados, lo cual sugiere que la tuberina podría regular el crecimiento celular por medio de la regulación de la expresión de la proteína p27kip1.⁵⁸ A demás, los heterocigotos compues-

tos que carecen de una copia de ambos TSC1 y TSC2 experimentan mayores incrementos en el numero de astrocitos. En conjunto, estas observaciones sustentan el rol de la tuberina y la hamartina como reguladores de la proliferación y el crecimiento celular en el sistema nervioso central.

Conclusiones

En los últimos años, se han adquirido vastos conocimientos con respecto a las funciones celulares de los genes TSC1 y TSC2 y a las proteínas que ellos codifican. Un más detallado entendimiento de la patogénesis molecular del complejo de esclerosis tuberosa es crucial para el desarrollo de terapias efectivas y altamente específicas. Rapamicina, un inhibidor específico de mTor, está actualmente siendo implementada en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer y se podría probar su utilidad en algunos tumores asociados al complejo de esclerosis tuberosa, incluyendo a aquellos que afectan el sistema nervioso central. De forma similar, los inhibidores de farnesiltransferasa son utilizados clínicamente como agentes anti-neoplásicos. Estas drogas podrían probar ser efectivas en la disrupción de la activación constitutiva de Rheb que ocurre en células que carecen de la función del complejo tuberina-hamartina. El desarrollo de modelos de ratones que precisamente recapitulan rasgos de la enfermedad humana, van a facilitar nuestra comprensión de la patogénesis de los defectos del desarrollo y la formación tumoral asociada al complejo de esclerosis tuberosa. Estos modelos van también a permitir la identificación de nuevos blancos farmacológicos que pueden ser aprovechados para el desarrollo de terapias efectivas y específicas para pacientes afectados con el complejo de esclerosis tuberosa.

Bibliografía

Asano E, Chugani DC, Muzic O, et al: Autism in Tuberous sclerosis complex is related to both cortical and subcortical dysfunction. *Neurology* 2001;51:1269-1267.

Benvenuto G, Li S, Brown SJ, et al: The tuberous sclerosis-1 (TSC) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberlin by inhibiting its ubiquitination. *Oncogene* 2000;19:6306-6316.

Castro AR, Rebhun JF, Clark CJ, Quilliam LA: Rheb binds TSC2 and promotes S6 kinase activation in a rapamycin and farnesylation-dependent manner. *J Biol Chem* 2003;278:32493-32496.

Cheadle JP, Reeve MP, Sampson JR, Kwiatkowski DJ: Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet* 2000; 107:1135-1138.

Clark GJ, Kinch MS, Rogers-Graham K, et al: The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras signaling and transformation. *J Biol Chem* 1997;272:10608-10615.

Crino PB, Dichter MA, Trojanowsky JQ, Eberwine J: Embryonic neuronal markers in tuberous sclerosis: Single cell molecular pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;93:14152-14157.

Curatolo P, Seri S, Verdecchia M, Bombardieri R: Infantile spasms in tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 2001;23:502-507.

Curatolo P: Neurological manifestations of tuberous sclerosis complex. *Childs nerv syst* 1996;12:515-521.

Cusmai R, Chiron C, Curatolo P, et al: Topographic comparative study of MRI and EEG in 34 children with tuberous sclerosis. *Epilepsia* 1990;31:747-755.

Dabora SL, Joswiak S, Franz DN, et al: Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet* 2001;68:64-80.

Dan HC, Sun M, Yang L, et al: Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberlin. *J Biol Chem* 2002;4:648-657.

European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium: Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on Chromosome 16. *Cell* 1993;75:1305-1315.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, et al: A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 1996;85:733-744.

- Fingar DC, Salama S, Tsou C, et al: Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/elf4E. *Genes Dev* 2002;16:1472-1487.
- Gao X, Pan D: TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* 2001;5:1383-1392.
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, et al: Tsc tumor suppressor proteins antagonize aminoacid-TOR signaling. *Nat Cell Biol* 2002;4: 699-704.
- Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T, et al: Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell* 2003;11:1457-1466.
- Gingras A, Kennedy SG, O'Leary MA, et al: 4E-PB1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt (PKB) signaling pathway. *Genes Dev* 1998;12:502-513.
- Gomez MR, Sampson JR, Whitmore VH: Tuberous sclerosis, 3rd ed. New York, Oxford University Press, 1999.
- Goodman M, Lamm SH, Engel A, et al: Cortical tuber count: a biomarker indicating neurologic severity of tuberous sclerosis complex. *J Child Neurol* 1997;12:85-90.
- Gutman DH, Zhang Y, Hasbani MJ, et al: Expresión of the tuberous sclerosis complex gene products, hamartin and tuberin in central nervous system tissues. *acta neuropathol (Berl)* 2000;5:276-286.
- Haluska P, Dy GK, Adjei AA: Farnesyl transferase inhibitors as anti-cancer agents. *Eu J Cancer* 2002;38:1685-1700.
- Hancock E, Osborne JP: Vigabatrin in the treatment of infantile spasms in tuberous sclerosis: Literature review. *J child Neurol.* 1999;41:123-126.
- Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, et al: Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet* 1996;59:400-406.
- Hodges AK, Li S, Maynard J, et al: Pathologic mutations in TSC1 and TSC2 disrupt the interaction between hamartin and tuberin. *Hum Mol Genet* 2001;15:217-224.
- Huang H, Potter CJ, Tao W, et al: PTEN affects cell size, cell proliferation, and apoptosis during Drosophila eye development. *Development* 1999;126:5365-5372.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, et al: TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTor signaling. *Nat Cell Biol* 2002; 4:648-657.
- Ito N, Rubin GM: gigas, Drosophila homolog of tuberous sclerosis gene product-2, regulates the cell cycle. *Cell* 1999;96:529-539.
- Jacob HJ, Kwitek AE: Rat genetics attaching physiology and pharmacology to the genome. *Nat Rev Genet* 2002;3:33-42.
- Jonhson C, O'Callaghan FJ, Osborne JP, et al: Learning disability and epilepsy in an epidemiological sample of individuals with tuberous sclerosis complex. *Psychol Med* 2003;33:335-344.
- Kobayashi T, Minowa O, Kuno J, et al: Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomatosis, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice. *Cancer Res* 1999;59:1206-1211.
- Kobayashi T, Minowa O, Sugitani Y, et al: A germ line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:8762-8767.
- Kwiatkowski DJ, Zhang H, Bandura JL, et al: A mouse model of TSC1 reveals sex-dependent lethality from liver hemangiomas and upregulation of p70S6 kinase activity in TSC1 null cells. *Hum mol Genet* 2002;11:525-534.
- Kwiatkowski DJ: Tuberous sclerosis: From tubers to mTor. *Ann Hum Genet* 2003;67:87-96.
- Lee A, Maldonado M, Baybis M, et al: Markers of cellular proliferation are expressed in cortical tubers. *Ann Neurol* 2003;53:668-673.
- Macleod KF, Jacks T: Insights into cancer from transgenic mouse models. *J Pathol* 1999;187:43-60.
- Milolosa A, Rosner M, Nellist M, et al: The TSC1 gene product, hamartin, negatively regulates cell proliferation. *Hum Mol Genet* 2000;9:1721-1727.
- Mirkin LD, Ey EH, Chaparro M: Congenital subependymal giant cell astrocytoma.: Case report with prenatal ultrasonogram. *pediatr radiol* 1999;29:776-780.
- Mizuguchi M, Kato M, Yamanouchi H, et al: Tuberin immunohistochemistry in brain, kidneys and heart with or without tuberous sclerosis. *Acta neuropathol (berl)* 1997;94:525-531.
- Mizuguchi M, Takashima S: Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain dev* 2001;23:508-515.
- Niida Y, Stemer-Rahamimov AO, Logrip M, et al: Survey of somatic mutations in tuberous sclerosis complex (TSC) hamartomas suggests different genetic mechanisms for pathogenesis of TSC lesions. *Am Hum Genet* 2001;69:493-503.
- Onda H, Crino PB, Zhang H, et al: TSC2 null neuroepithelial cells are a model for human tuber giant cells and show activation of an mTor pathway. *Mol cell Neurosci* 2002;21:561-574.
- Park SH, Pepkowitz SH, Kerfoot C, et al: Tuberous sclerosis in a 20week gestation fetus: Immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1997;94: 180-186.
- Patel PH, Thapar N, Guo L, et al: Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and growth control. *J cell Sci* 2003;116:3601-3610.
- Plank TL, Yeung RS, Henske EP: Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles. *Cancer res* 1998;58:4766-4770.
- Potter CJ, Huang H, Xu T: Drosophila TSC1 functions with TSC2 to antagonize insulin signaling regulating cell growth, cell proliferation and organ size. *Cell* 2001;105:357-368.
- Potter CJ, Pedraza LG, Xu T: Akt regulates growth by directly phosphorylating TSC2. *Nat cell boil* 2002;4:658-665.
- Povey S, Burley MW, Attwood J, et al: Two loci for tuberous sclerosis: one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet* 1994;58:107-127.
- Ramesh V: Aspects of tuberous sclerosis complex (TSC) protein function in the brain. *Biochem Soc Trans* 2003;31:579-583.
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, et al: Rheb promotes cell growth as component of the insulin Rheb signaling network. *Nat Cell Biol* 2003;5:566-571.
- Shepard CW, Houser OW, Gomez MR: MR findings in Tuberous Sclerosis Complex and correlation with seizure development and mental impairment. *AJNR Am J Neuroradiol* 1995;16:149-155.
- Shepard CW, Scheithauer BW, Gomez MR, et al: Subependymal giant cell astrocytoma: A clinical, pathologic, and flow cytometry. *Neurosurgery* 1991;38:864-868.
- Soucek T, Holz G, Bernaschek G, Hengstschlager M: A role of the tuberous sclerosis gene-2 product during neuronal differentiation. *Oncogene* 1998;16:2197-2204.
- Soucek T, Pusch O, Wienecke R, et al: Role of the tuberous sclerosis gene-2 product in cell cycle control. Loss of the tuberous sclerosis gene-2 induces cells to enter S phase. *J Biol Chem* 1997;272:29301-29308.
- Stocker H, Radimersky, Schindelholtz B, et al: Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in Drosophila. *Nat Cell Biol* 2003;5:559-565.
- Stoker H, Hafen E: Genetic control of cell size. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10:529-535.
- Tee AR, Fingar DC, Manning BD, et al: Tuberous sclerosis complex-1 and 2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTor)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13571-13576.
- Uhlmann EJ, Apicelli AJ, Baldwin RL, et al: Heterozygosity for the tuberous sclerosis complex (TSC) gene products results in increased astrocyte numbers and decrease p27Kip1 expression in TSC2 +/- cells. *Oncogene* 2002;21:4050-4059.
- Van Slegtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, et al: Identification of the tuberous sclerosis gene TSC 1 on chromosome 9q34. *Science* 1997;277:805-808.
- Van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, et al: Interaction between hamartin and tuberin, the TSC1 and TSC2 gene products. *Hum Mol Genet.* 1998;7:1053-1057.
- Wienecke R, Guha A, Maize JC, et al: Reduced TSC2 RNA and protein in sporadic astrocytomas and ependymomas. *Ann Neurol* 1997;15:1611-1616.
- Yeung RS, Katsetos CD, Klein-Szanto A: Subependymal astrocytic hamartomas of the Eker rat model of tuberous sclerosis. *Am J Pathol* 1997;151:1477-1486.
- Yeung RS, Xiau GH, Jin F, et al: Predisposition to renal carcinoma in Eker rat is determined by germline mutation of the tuberous sclerosis (TSC2) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11413-11416.
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, et al: Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumor suppressor proteins. *Nat Cell Biol* 2003;5:578-581.
- Bebin EN, Kelly PJ, Gomez MR: Surgical treatment for epilepsy in cerebral tuberous sclerosis. *Epilepsia.* 1993 Jul-Aug;34(4):651-7.