



國立臺灣大學醫學院分子醫學研究所

碩士論文

Institute of Molecular Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

結節硬化症：REDCap 資料庫的建立以及次世代定序

基因檢測

Tuberous Sclerosis Complex (TSC): REDCap Database

Establishment and Next-generation Sequencing (NGS)-

based Genetic Testing

李昭萱

Chao-Hsuan Li

指導教授：陳沛隆 博士

Advisor: Pei-Lung Chen, M.D., Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July, 2018

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書



結節硬化症：REDCap 資料庫的建立以及次世代定序
基因檢測

Tuberous Sclerosis Complex (TSC): REDCap Database
Establishment and Next-generation Sequencing (NGS)-
based Genetic Testing

本論文係李昭萱君（P05448003）在國立臺灣大學分子醫學研究所完成之碩士學位論文，於民國 107 年 07 月 11 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

陳沛隆 (簽名)
(指導教授)

謝豐舟 楊偉勳

系主任、所長

李昌仁 (簽名)

致謝

不知不覺兩年就過去了，想當初剛踏進來的一幕幕，至今仍歷歷在目。首先，我要感謝一開始佳臻帶領我紮下所有實驗和概念的基礎；感謝毓慈和勝凱，自從踏進這個實驗室，就接受了他們無數的幫忙，即使他們手邊也很忙，卻總願意抽身相助；感謝育華，一步一步地教我如何設計 TSC panel；以及志善，協助 NGS 上機和資料分析；感謝杜博士全力協助 TSC REDCap 的建立以及後續多次修改而不厭煩；感謝桂秋、雲潔和孟霖，在自己的研究計畫負擔之外，還額外花時間和心力幫忙 TSC 計畫案進行 minigene 實驗。還有非常重要的孟涵，在我工作不方便抽身時，給予全力的支援，沒有她的幫忙，我不可能忙得過來；感謝幼玫時時提供各方面的經驗協助；感謝建銘在關鍵時刻相挺；感謝愛珠姐、奕蓁、惠薰，隨時引導常不知所措的遺傳諮詢班學生，做為結節硬化症門診穩固的立基。

另外，謝謝我的遺傳諮詢班同學兼工作同事：瑞玲，做為我上課過程中最大的陪伴和支持力量。讓心智脆弱、無毅力的我，不可思議地完成學業。還有謝謝我公司實驗室的主管，支持我在職進修的決定，配合我上課實習的時間開會，接受隨時消失不見的我；謝謝我的超級工作夥伴們，隨時做我的接應、完美地支援我工作上各環節的進行。還要感謝我的家人，幫我省了非常多珍貴的時間；我的朋友，在我低潮萎靡時給予鼓勵；也感謝實習每一站的醫師和每一個願意讓我諮詢的病人，讓我能慢慢摸索遺傳諮詢的真諦。在碩士論文完成之際，感謝謝豐舟教授和楊偉勛教授不畏颱風如期蒞臨口試，協助我完成碩士學位的重要里程碑。

最後，要謝謝讓我有機會認識這麼多超棒的人的陳沛隆醫師，引導我踏入陌生的 NGS 領域。出社會，深深覺得機會很重要，尤其是非自己的專業，常常連嘗試、學習、觸碰的機會都沒有。尤其在我一開始就展現出自己脆弱不合適的一面，老師還願意給我機會努力去嘗試，真的非常感謝。整個求學過程中，老師細膩的指點，讓我受益匪淺，見識到各領域強者雲集，共同激盪琢磨出的思想火花，可以如此美。能當老師的學生是一件非常幸福的事。

中文摘要

結節硬化症是一種罕見的體染色體顯性遺傳疾病，因 *TSC1* 或 *TSC2* 基因生殖細胞突變，導致全身各處器官和組織產生錯構瘤。目前有 10~25% 臨床上確診為結節硬化症的病人，取其周邊血液做次世代定序基因檢測，找不到致病位點。其中有部分可能是 *TSC1* 或 *TSC2* 低比例鑲嵌型，或者致病位點隱藏在較深會影響剪接的內涵子區域，於檢測時被忽略。

本研究收入了曾於臺大醫院結節硬化症整合門診看診的病人及其家屬共 508 位，含 222 個家族。根據臨床表徵，其中有 168 個家族先證者 (proband) 被確診為結節硬化症；10 個家族臨床懷疑為結節硬化症但尚不足以確診；44 個家族原本被懷疑是結節硬化症，經過轉介來臺大醫院評估後認為非結節硬化症。將這些個案的家族史、臨床表徵、基因檢測、各科追蹤檢查紀錄等資訊，整理並在臺大安全網域下建構線上 TSC REDCap 資料庫，呈現臺灣本土結節硬化症疾病的資料。另外，進行兩代直系親屬的基因檢測，確認一同時患有結節硬化症和多囊腎的病人身上兩個致病變異點在染色體上的相位關係；並從過去周邊血液基因檢測未找到生殖細胞突變的 3 位病人中，取其皮膚病灶檢體進行基因檢測，偵測到低比例的生殖細胞 *TSC1* 或 *TSC2* 突變鑲嵌型狀況；探討一患有肝細胞癌 (HCC) 的 B 型肝炎帶原結節硬化症病人，其肝臟腫瘤切片的基因狀況；設計 minigene 功能性測試系統來確認未確定致病性的剪接位變異點其轉錄出的 mRNA 是否有異。

在本研究臨床確診為結節硬化症的家族中，次世代定序基因檢測確診檢出率約 88%，另 3% 為未能確定致病性的變異點 (VUS)，剩下 9% 沒有發現任何懷疑的變異點 (NMI)。其中有 20% 為 *TSC1* 基因變異，80% 為 *TSC2* 基因變異；30% 為家族遺傳而來，70% 為新發生的變異。對於同時帶有結節硬化症和多囊腎兩個致病變異點的病人，可以透過進行直系親屬基因檢測來釐清兩變異點的相位關係；並利用皮膚病灶檢體提高低比例鑲嵌型患者，生殖細胞突變被檢測出來的比率；觀察到一位帶有 *TSC2* 致病生殖細胞變異且同時為 B 型肝炎帶原的結節硬化症病



人，發展出肝細胞癌 (HCC) 時，則其肝腫瘤會較大且侵略性更強。針對肝腫瘤切片做基因檢測，發現除患者原本在 *TSC2* 基因上的生殖細胞錯義突變之外，另發生一個體細胞突變：約 2Mb 包含 *TSC2* 的大片段缺失，使此區域成為異合性丟失的狀況 (LOH)。免疫治療搭配 everolimus 治療對此病人肝腫瘤擴張有控制效果。最後，針對未確定致病性的剪接位變異點設計的 minigene 系統將繼續進行實驗確認。

中文關鍵詞：結節硬化症、線上資料庫、致病性不明的剪接位變異、低比例鑲嵌型、兩致病變異點的相位關係、B 肝帶原肝細胞癌病灶、次世代定序。

Abstract



Tuberous Sclerosis Complex (TSC) is a rare autosomal dominant disease due to germline disease-causing variants in either *TSC1* or *TSC2* gene, and may develop multisystem hamartomas. However, 10%-25% of TSC patients remain genetically undiagnosed after conventional genetic testing. Part of them may carry variant(s) with low percentage mosaicism or have variants affecting splicing in deep introns, which would be missed out during interpretation of the NGS data.

We enrolled 508 subjects from 222 families from the TSC Integrated Clinic at National Taiwan University Hospital (NTUH). Among them, 168 probands were TSC-confirmed, 10 probands were TSC-suspected, and 44 probands eventually did not meet the clinical criteria of TSC. We established an online REDCap database for our TSC cohort, and collected and uploaded family histories, phenotypes, genotypes, and the follow-up examinations of these subjects into the database. Additionally, we took advantage of the next-generation sequencing (NGS)-based genetic testing to solve several critical issues. Notable examples included, but not limited to, solving the phasing issue of *TSC2* and *PKD1* variants in a family, detecting possible low percentage mosaic germline mutations in skin lesions of 3 TSC patients without identifiable variants in peripheral blood samples previously, and analyzing the possible second hit of

from the hepatoma biopsy samples of a TSC patient with chronic hepatitis B and newly diagnosed hepatocellular carcinoma (HCC). Finally, we designed minigene experiments trying to confirm the pathogenicity of splicing variants of unknown significance (VUS).

In our study, for the 168 probands with clinically definite TSC, the detection rate of pathogenic and likely pathogenic germline variants in *TSC1* or *TSC2* gene was 88%; additional 3% of TSC patients had VUS, and 9% remained no mutation identified (NMI). Among TSC probands with genetic diagnosis, 20% fell in *TSC1* and 80% fell in *TSC2* gene. Thirty percent of the variants were inherited, while the other 70% were de novo mutations. For the patient with two variants in the *TSC2* and *PKD1* genes, we confirmed that the two variants were on the same chromosome 16 haplotype, based on the co-segregation observed in his son. And, we could increase the detection rate of low percentage mosaic germline mutation by analyzing the NGS data of their skin lesion samples compared with the data of peripheral blood samples. For the TSC patient with chronic hepatitis B as well as newly diagnosed HCC, we found a pathogenic *TSC2* germline missense variant and a *TSC2* LOH somatic mutation at least 2Mb in size in the HCC biopsy. The HCC initially grew fast and developed aggressively. Treatment combined with immunotherapy and everolimus, which is a mTOR inhibitor, seemed to be initially effective for disease control. Finally, the minigene experiments of VUS splicing variants are still underway.

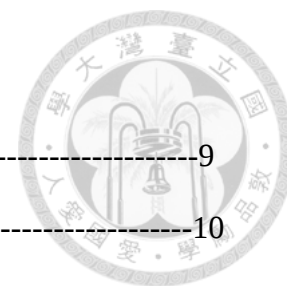
English key words: Tuberous Sclerosis Complex (TSC), online database, splicing
variants of unknown significance (VUS), low percentage mosaicism, haplotyping,
HBV+HCC biopsy, next-generation sequencing (NGS)



目錄



論文委員會審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii-iv
Abstract	v-vii
第一章 研究背景與動機	
1.1 結節硬化症的疾病介紹	1
1.2 結節硬化症的歷史演進	1
1.3 結節硬化症的致病機轉	1-2
1.4 結節硬化症的臨床表徵	2-3
1.5 結節硬化症的診斷標準	
1.5.1 臨床診斷標準	4
1.5.2 基因診斷標準	5
1.6 結節硬化症資料庫	
1.6.1 國際上現有的結節硬化症 LOVD 資料庫	5-6
1.6.2 臺灣本土結節硬化症資料	6
1.7 結節硬化症在基因檢測診斷上遇到的困難	
1.7.1 找不到懷疑的致病變異點	6-7
1.7.2 找到無法判讀其致病性的變異點 (VUS)	7
1.8 <i>TSC1</i> 和 <i>TSC2</i> 基因變異點的功能性評估	8
1.9 遺傳諮詢 (genetic counseling)	8-9



1.10 研究動機

1.10.1 臺大醫院 TSC REDCap 整合型資料庫的建立-----	9
---------------------------------------	---

1.10.2 結節硬化症患者基因檢測上難解的問題-----	10
-------------------------------	----

第二章 研究方法

2.1 研究對象

2.1.1 受試者來源與收案標準-----	11
-----------------------	----

2.1.2 同意書簽署-----	12
------------------	----

2.1.3 檢體-----	13
---------------	----

2.2 研究方法

2.2.1 DNA 萃取-----	13-14
-------------------	-------

2.2.2 偵測 DNA 品質-----	14-15
----------------------	-------

2.2.3 TSC panel-----	15
----------------------	----

2.2.4 次世代定序 (next-generation sequencing, NGS) -----	16-17
---	-------

2.2.5 變異點致病性的判讀-----	17-18
----------------------	-------

2.2.6 聚合酶連鎖反應 (PCR) 及傳統定序 (Sanger) -----	18
--	----

2.2.7 minigene assay-----	18-19
---------------------------	-------

2.2.8 REDCap 資料庫-----	19
-----------------------	----

2.2.9 PhenoTips 家族譜圖繪製-----	19
-----------------------------	----

第三章 研究結果

3.1 REDCap 資料庫

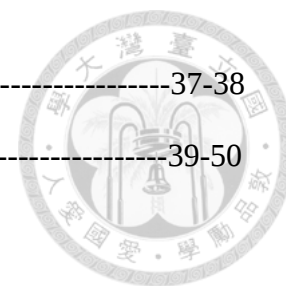
3.1.1 REDCap 表單及項目欄位-----	20-27
---------------------------	-------

3.1.2 臺大醫院結節硬化症整合門診病人的基因檢測結果統計-----	28-30
-------------------------------------	-------

3-2 結節硬化症患者基因檢測上難解的問題

3.2.1 確認同一患者身上兩個致病變異點在染色體上的相位關係-----	31-33
--------------------------------------	-------

3.2.2 提升低比例 <i>TSC1</i> 或 <i>TSC2</i> 鑲嵌型患者的基因檢測檢出率-----	34-36
--	-------



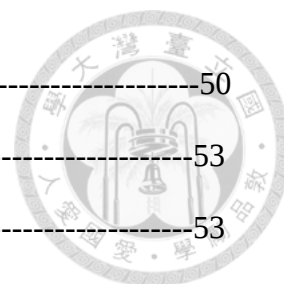
3.2.3 檢測 HBV+HCC 的結節硬化症病人的 second hit	37-38
3.2.4 利用 minigene 來確認基因剪接 (splicing) 狀況	39-50
3.3 遺傳諮詢	
3.3.1 案例一 (TSC201)	51
3.3.2 案例二 (TSC419)	52-53
3.3.3 案例三 (TSC418)	54-55
3.3.4 案例四 (TTSC00480)	55-56
第四章 討論	
4.1 臺灣的結節硬化症流行病學資料	57
4.2 基因檢測檢出率	57
4.3 HBV+HCC	58
4.4 遺傳諮詢	58
第五章 結論	
參考文獻	
附錄	
附錄一、TSC PCR primers	
(1) <i>TSC1</i> PCR primers	64-65
(2) <i>TSC2</i> , <i>PKD1</i> PCR primers	65-67
(3) minigene PCR primers for insert DNA	68
(4) PCR programs	68-69
(5) minigene primers for Sanger sequencing	70-71
附錄二、minigene assay 實驗流程	71-74
附錄三、TSC panel	75-84
附錄四、結節硬化症臨床確診家族之 proband 基因檢測結果	85-92

圖目錄

圖一、 REDCap database - TSC enrollment list-----	20
圖二、 REDCap database - medical history -----	21
圖三、 REDCap database - family TSC history-----	21
圖四、 REDCap database - education and occupation-----	22
圖五、 REDCap database - clinical diagnosis - major feature-----	23
圖六、 REDCap database - clinical diagnosis - minor feature-----	24
圖七、 REDCap database - clinical diagnosis - 復健科-----	24
圖八、 REDCap database - clinical diagnosis - 胸腔科及肝臟、腎臟科-----	25
圖九、 REDCap database - clinical diagnosis - 神經科-----	26
圖十、 REDCap database - clinical symptoms-----	26
圖十一、 REDCap database - genetic testing-----	27
圖十二、受試 222 個家族 TSC 臨床診斷結果-----	28
圖十三、145 個家族進行基因檢測的結果-----	28
圖十四、受試家族 <i>TSC1</i> 和 <i>TSC2</i> 的比例-----	29
圖十五、TSC proband 遺傳/偶發比例 -----	29
圖十六、基因變異點各類型的分佈比例-----	29
圖十七、基因變異類型分類中，在 <i>TSC1</i> 或 <i>TSC2</i> 基因的分佈比例-----	30
圖十八、TSC338 之 <i>TSC2</i> 基因次世代定序檢測結果-----	31
圖十九、TSC338 之 <i>TSC2</i> 基因桑格定序檢測結果-----	31
圖二十、TSC338 之 <i>PKD1</i> 基因次世代定序檢測結果-----	32
圖二十一、TSC338 之 <i>PKD1</i> 基因桑格定序檢測結果-----	32
圖二十二、TSC418 之 <i>TSC2</i> 基因桑格定序檢測結果-----	33
圖二十三、TSC418 之 <i>PKD1</i> 基因桑格定序檢測結果-----	33
圖二十四、TSC265 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果-----	35

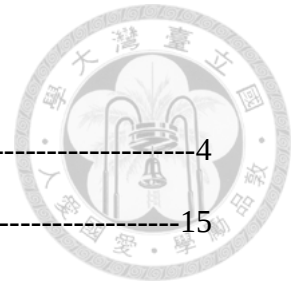
圖二十五、TSC411 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果-----	35
圖二十六、TSC417 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果-----	36
圖二十七、TSC419 桑格定序結果-----	37
圖二十八、TSC419 次世代定序結果-----	38
圖二十九、TSC419 第 16 號染色體發生 LOH -----	38
圖三十、TSC419 第 16 號染色體發生 LOH -----	38
圖三十一、TSC144 (TF042) 家族譜圖-----	39
圖三十二、TSC144 次世代定序結果-----	39
圖三十三、TF042 家族桑格定序結果-----	40
圖三十四、TSC144 minigene insert DNA 設計-----	40
圖三十五、TSC201 (TF064) 家族譜圖-----	41
圖三十六、TSC201 次世代定序結果-----	41
圖三十七、TF064 家族桑格定序結果-----	42
圖三十八、TSC201 minigene insert DNA 設計-----	43
圖三十九、TSC160 (TF051) 家族譜圖-----	44
圖四十、TSC160 次世代定序結果-----	44
圖四十一、TF051 家族桑格定序結果-----	45
圖四十二、TSC160 minigene insert DNA 設計-----	46
圖四十三、TSC203 (TF065) 家族譜圖-----	47
圖四十四、TSC203 次世代定序結果-----	47
圖四十五、TF065 家族桑格定序結果-----	48
圖四十六、TSC203 minigene insert DNA 設計-----	48
圖四十七、TSC270 (TF085) 家族譜圖-----	49
圖四十八、TSC270 次世代定序結果-----	49
圖四十九、TF085 家族桑格定序結果-----	50

圖五十、TSC270 minigene insert DNA 設計-----	50
圖五十一、TSC201 家族譜圖-----	53
圖五十二、TSC419 家族譜圖-----	53
圖五十三、TSC418 家族譜圖-----	55
圖五十四、TSC00480 家族譜圖-----	56



表目錄

表一、結節硬化症臨床診斷標準-----	4
表二、TSC NGS panel-----	15





第一章 研究背景與動機

1.1 結節硬化症的疾病介紹

結節硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) 是一種會系統性影響人體全身，使各處器官容易產生良性錯構瘤 (hamartoma) 的遺傳疾病，影響的部位包括：腦部、皮膚、腎臟、肺部、心臟等，患者通常也會有癲癇、心智發展遲緩等症狀。發病的年齡分布很廣，從嬰兒到成人皆可見。臨床表現每個患者間差異性很大，從嚴重到輕度都有可能。

結節硬化症在新生兒的盛行率約 1/6000~1/10000[1]，目前無發現族群或性別上的差異。結節硬化症是一種體染色體顯性遺傳的疾病，大約 1/3 的患者是從父母遺傳而來，2/3 的患者是本身產生了偶發性基因突變。目前已知結節硬化症患者身上的 *TSC1* 或 *TSC2* 基因，產生致病性的變異所造成，影響該基因製造出來的蛋白質功能[2]。在有找到致病基因變異的患者中：約 21% 是 *TSC1*，79% 是 *TSC2* 基因造成[3]。疾病穿透率高 (penetrance)，若兩條染色體其中一條染色體帶有致病的基因變異，一生中幾乎都會發病。

1.2 結節硬化症的歷史演進

結節硬化症最早被詳細報導出是在 1862 年 von Recklinghausen 首先提出：剛出生即死亡的嬰兒身上，心臟腫瘤和腦內結節可能存在的疾病關聯性[4]。1880 年 Bourneville 首次深入描述此疾病[5]。1993 年發現了在第 16 號染色體上的 *TSC2* 基因[6]，1997 年又發現了第 9 號染色體上的 *TSC1* 基因[7]。2012 年開會制定了結節硬化症的臨床和基因診斷標準[8]。

1.3 結節硬化症的致病機轉

TSC1 基因位於人類第九號染色體 9q34.3 的位置，由 23 個外顯子組成 (NM_000368)，整個 *TSC1* 基因共 53,273 個核苷酸，會轉錄出 8.6 kb 的 RNA，轉

譯出 30 kDa 的 TSC1 (hamartin) 蛋白；TSC2 基因位於第十六號染色體 16p13.3 的位置，由 41 個外顯子組成 (NM_000548.3)，整個 TSC2 基因共 41,255 個核苷酸，會轉錄出 5.5 kb 的 RNA，轉譯出 180 kDa 的 TSC2 (tuberin) 蛋白。TSC1 和 TSC2 皆屬於抑癌基因 (tumor suppressor gene)，所轉譯出的 TSC1 和 TSC2 這兩個蛋白會形成一個蛋白複合物 (TSC1-TSC2 complex)，作用於人體內調控細胞生長的 mTOR (the mammalian target of rapamycin) 路徑中上游，抑制體內細胞過度增生。

結節硬化症的患者在受精卵形成時，細胞就已在 TSC1 或 TSC2 其中一個等位基因 (allele) 上，帶有第一個致病性的變異 (first hit)，稱為生殖系突變 (germline mutation)。若在接下來的細胞分裂過程中，有細胞在同一基因的第二的等位基因 (allele) 上，再發生第二次致病突變 (second hit)，即體細胞突變 (somatic mutation)，則此細胞所在器官或組織的細胞生長會不受控制，而產生腫瘤[9]。

1.4 結節硬化症的臨床表徵

結節硬化症患者在臨床上的表徵很廣泛，每個人的嚴重程度差異性也很大，可能表現在皮膚、神經、心臟、腎臟、肺臟、眼部、口腔或其他器官，臨床多因為癲癇、智能不足、皮膚表徵、全身多處產生腫瘤……等而被發現。任何單一症狀都不足以診斷為結節硬化症，需要同時符合數個表徵，綜合評估才能下診斷。

不同的臨床表徵，發生在不同的發展階段。例如：腦皮質不良增生 (cortical tubers) 和心臟橫紋肌瘤 (cardiac rhabdomyomas) 發生在胚胎生成時期，是嬰兒時期結節硬化症表徵的典型。有 90% 以上的結節硬化症病人有皮膚表徵。脫色斑 (hypopigmented macules)，通常在嬰兒期 (小於一歲) 或兒童早期 (一至五歲) 發現；鯊魚皮斑 (shagreen patch) 通常在五歲以後，發生率增加；指甲邊纖維瘤 (ungual fibromas) 通常發生在青春期以後到成人階段；臉部血管纖維瘤 (facial

angiofibromas) 則通常在兒童晚期或青春期中被發現。

其他症狀如：腦室管下巨細胞星狀瘤 (subependymal giant-cell tumor) 通常發生在兒童期或青春期中；腎臟囊腫 (renal cysts) 在嬰兒期或兒童早期被發現；血管平滑肌脂肪瘤 (angiomyolipomas) 發生在兒童期、青春期中、成人期；肺淋巴管平滑肌增生症 (pulmonary lymphangiomyomatosis) 則常發生在青春期中女生或女性結節硬化症患者[2]。



1.5 結節硬化症的診斷標準

結節硬化症的診斷標準分為臨床診斷標準和基因診斷標準兩種，只要符合其中一種，就可以確診患者為結節硬化症。

1.5.1 臨床診斷標準：

表一、結節硬化症臨床診斷標準

主要表徵 (Major features)
1.脫色斑 (Hypomelanotic macules) ≥ 3 ，至少直徑 5mm 2.臉部血管纖維瘤 (Angiofibromas)或頭部纖維化斑塊 (fibrous cephalic plaque) ≥ 3 個 3.指甲邊纖維瘤 (Ungual fibromas) ≥ 2 個 4.鯊魚皮斑 (Shagreen patch) 5.多個視網膜錯構瘤 (Multiple retinal hamartomas) 6.腦皮質不良增生 (Cortical dysplasias) 7.腦室管下結節 (Subependymal nodules, SENs) 8.腦室管下巨細胞星狀瘤 (Subependymal giant cell astrocytoma, SEGAs) 9.心臟橫紋肌瘤 (Cardiac rhabdomyoma) 10.肺淋巴血管平滑肌增生症 (Lymphangiomyomatosis, LAM) 11.腎血管平滑肌脂肪瘤 (Angiomyolipomas, AML) ≥ 2 個
次要表徵 (Minor features)
1.斑駁樣的皮膚斑 “Confetti” skin lesions 2.牙齒琺瑯質凹痕 (Dental enamel pits) >3 個 3.口腔內纖維瘤 (Intraoral fibromas) ≥ 2 個 4.視網膜無色斑 (Retinal achromic patch) 5.多囊腎 (Multiple renal cysts) 6.非腎臟錯構瘤 (Nonrenal hamartomas)
確診：兩個主要表徵或者一個主要表徵加上兩個以上次要表徵。 疑似：一個主要表徵或兩個以上次要表徵。 *若同時有肺淋巴血管平滑肌增生症 (LAM) 和腎血管平滑肌脂肪瘤 (AML) 存在， 僅視為一個主要表徵[8]。



1.5.2 基因診斷標準

經由檢測個案正常組織中的 DNA，在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因上是否存在一個致病性變異，做為結節硬化症的基因診斷標準。致病性變異的定義是此變異會明確造成 *TSC1* 或 *TSC2* 基因：

- (1)轉譯出來的蛋白質喪失原有的功能，如：移碼突變 (frameshift mutation)、無義突變 (nonsense mutation)。
- (2)無法轉譯出蛋白質，如：大片段的刪除 (large deletion)。
- (3)轉譯出的蛋白，過去曾接受過功能性評估，被認為會影響蛋白質原有的功能而致病，如：錯義突變 (missense mutation)。

其他 *TSC1* 或 *TSC2* 的變異點，若無足夠證據確認其對所轉錄出的蛋白質功能的影響，就無法確診此個案為結節硬化症。大約有 10%~25% 的結節硬化症病人在目前的基因檢測方法下，找不到 *TSC1* 或 *TSC2* 致病變異點，因此即使基因檢測結果正常，仍無法排除是結節硬化症病人[8]。

1.6 結節硬化症資料庫

1.6.1 國際上現有的結節硬化症 LOVD 資料庫

目前國際上已經存在可靠的結節硬化症資料庫有 LOVD (Leiden Open Variation Database)- Tuberous Sclerosis Database，於 2015 年建立，由英國學者 Sue Povey 和 Rosemary Ekong 收集，針對和結節硬化症相關的 *TSC1* 和 *TSC2* 基因，將 2004~2014 年曾經有研究團隊發現的變異點全都登錄其上，包含 Cardiff-Rotterdam Tuberous Sclerosis Mutation Database 和 David Kwiatkowski's Tuberous Sclerosis Project，以及各出版文獻和各來源提供的資料整合而成。由荷蘭萊頓大學醫學中心 (Leiden University Medical Center) 持續更新至今，並試著預測各變異點的致病性。目前此 LOVD 資料庫中，*TSC1* 基因有 2540 個變異點被紀錄，893 種；*TSC2* 基因有 7239 個變異點，2610 種。成為目前世界上結節硬化症最完整的

基因變異點資料庫。

但我們在從事結節硬化症的基因檢測時，發現僅約 40% 的變異點可以在現有的 LOVD 資料庫找到紀錄，找不到資料的需要額外搜查文獻，而多數時候在文獻上也未曾被報導過。可能是因為結節硬化症並沒有特別容易發生基因變異的位點 (hot spot)，也可能是各族群容易發生變異的點位具差異性。

1.6.2 臺灣本土結節硬化症資料

若以全球結節硬化症約萬分之一的發生率來推估，臺灣大約有 2300 名結節硬化症患者，但目前依健保就醫紀錄，至 2017 年 8 月為止，僅約 557 人就醫確診。其中有 179 位 (3 成) 曾到臺大醫院看診。近來臺大成功研發出的國內第一支給結節硬化症患者專用的皮膚外用藥膏 Rapamycin，於 2017 年 9 月始提供給結節硬化症病人有效的皮膚治療，如此更促使了平時在各地醫院看診或沒在定期追蹤的病人集中到臺大來看診，使得臺大醫院成為臺灣研究結節硬化症最完整的立基。臺大的「結節硬化症整合門診」從 2010 年 7 月 12 日開辦，整合了 9 科：神經科、泌尿科、胸腔科、皮膚科、復健科、心臟科、眼科、牙科、基因醫學部遺傳專科的醫生，並搭配社工師、心理諮商師、遺傳諮詢師、結節硬化症協會參與，定期追蹤臺灣結節硬化症病人的肺部、腹部、神經、復健...等，給予病患最有效的整合性評估和照護。

1.7 結節硬化症在基因檢測判讀上遇到的問題

1.7.1 找不到懷疑的致病變異點

目前臨床症狀評估後確診是結節硬化症的病人，在做次世代定序基因檢測時，仍有約 10~25% 的病人找不到懷疑的致病變異點。可能的解釋原因包括：

(1)尚存在現階段的次世代定序或桑格定序基因檢測方法，無法偵測出的 *TSC1* 和 *TSC2* 致病變異型式。

(2)目前只有位在外顯子上下游 1 至 2 個鹼基的內涵子區域發生變異，會被判定為確定會影響 RNA 剪接 (splicing) 的功能。但會影響基因剪接的 DNA 區域，還可能位於啟動子 (promoter)、增強子 (enhancer)，或位在更深的內涵子內，而在判讀上被忽略。

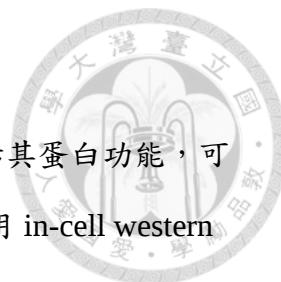
(3)可能是極低比例 *TSC1* 和 *TSC2* 基因變異的鑲嵌型 (mosaicism)，在資料分析的過程中被當成背景雜訊而被忽略。

(4)除了 *TSC1* 和 *TSC2* 基因以外，可能還存在第三個或以上的基因，會造成結節硬化症而尚未被發現或釐清[10-13]。

1.7.2 找到無法判讀其致病性的變異點(VUS)

最常見難以判定其變異致病性的狀況即是：錯異變異 (missense variant)、非移碼類型的小片段插入或刪除 (in-frame deletion/insertion)、隱藏在外顯子上下游 1 至 2 個鹼基以外會影響 RNA 剪接的變異 (splice site variant)、太靠近蛋白尾端不足以造成 nonsense-mediated mRNA decay (NMD) 的 nonsense 突變[14, 15]，如果基因檢測實驗室本身無足夠資源做進一步 *TSC1* 或 *TSC2* 轉錄或轉譯的功能性評估 (functional assessment)，判讀其致病性就變得較困難。

這些類型的變異點通常需藉助同時檢測其父母或其他患病/非患病家屬是否帶有相同變異點，比對臨床表現，判定此變異點是否遺傳自父母，在有結節硬化症疾病的家族各代成員中，此變異點是否有共分離 (co-segregation) 的狀況。搭配相關軟體如：SIFT[16, 17]、Polyphen-2[18, 19]、HSF[20]等預測來推估其致病性；或者需要仰賴過去世界各國累積在資料庫中的資料紀錄，若資料庫中沒有被記錄過，或有被報導過但臨床無法確定是否致病時，就會造成基因診斷結節硬化症的困難。



1.8 *TSC1* 和 *TSC2* 基因變異點的功能性評估

針對不確定其致病性的錯義變異 (missense variant)，欲評估其蛋白功能，可以將帶有目標 *TSC1* 或 *TSC2* 錯義變異點的 DNA 送進細胞，利用 in-cell western (ICW) assay 半定量的方式，分別偵測 *TSC1* 和 *TSC2* 蛋白被製造出來的量，以及偵測 S6K 和 T389-phosphorylated S6K 的量。若 T389-phosphorylated S6K 的量較正常為多，代表 *TSC1* 或 *TSC2* 抑制 mTOR 的功能變低，代表此 *TSC1* 或 *TSC2* 錯義變異點具有致病性[21-25]。

針對不確定其致病性、隱藏在外顯子上下游 1 至 2 個鹼基以外會影響 RNA 剪接的剪接位變異 (splicing site variant)，可以利用設計一個 minigene 系統，將懷疑的剪接位變異所位在最近的外顯子，至其前後一個外顯子的範圍區域，設計特殊的引子，利用 PCR 的方式，製造此範圍區域的 DNA 片段。將此目標 DNA 片段利用 Gibson assembly 的方式 clone 進 vector 中，送入 HEK293 細胞表現。最後再抽取 RNA，以 RT-PCR 翻轉回 DNA 序列，做定序，觀察帶有目標剪接位變異和不帶有目標剪接位變異的基因剪接產物是否有異，來判定此剪接位變異是否具有致病性[26, 27]。

1.9 遺傳諮詢 (genetic counseling)

美國早在 1969 年就開始針對遺傳諮詢做專業領域的培訓。隨著桑格定序、次世代定序基因檢測技術逐漸成熟，基因診斷成為趨勢，遺傳諮詢的角色和功能愈來愈被重視。臺大醫學院從 2004 年以來，也開始培訓遺傳諮詢人才，作為醫生和病患之間遺傳疾病的溝通橋樑。

1974 年，Fraser 醫生整理了 1973 年一場美國人類遺傳學會 (the American Society of Human Genetics) 的年度會議內容，針對遺傳諮詢進行論辯後所達到的共識，希望喚起大眾對遺傳諮詢的規範和重視。遺傳諮詢是處理一個家族遺傳疾病的再發率及風險的一個溝通過程，需要借助一個經過適當訓練的人來幫助個人



及家庭一同面對：

- (1)瞭解醫學事實，包含醫學診斷、疾病的可能進程，和可行的處置方法。
- (2)理解疾病在此家族間的遺傳模式，在某個家族成員身上及後代的發生風險。
- (3)了解針對此疾病的再發風險，有什麼選擇可以應對。
- (4)評估他們承擔的風險及其家族目標後，選擇對他們來說適合採取的措施。
- (5)對已患病或有患病風險的家族成員，面對疾病做最好的可能調適[28]。

隨著遺傳諮詢的倫理問題逐漸被重視，1992 年國家遺傳諮詢學院 (National Society of Genetic Counselors, NSGC) 始納入遺傳諮詢的倫理規範 (The Code of Ethics, COE)，並於 2006 年重新修正[29]。2016 年倫理委員會 (the NSGC Code of Ethics Review Task Force, COERTF) 又再次進行道德審查修正[30]。針對遺傳諮詢人員本身、遺傳諮詢人員和被諮詢者之間、遺傳諮詢人員和其所屬機構之間、遺傳諮詢人員和整個社會之間的關係、行為，進行倫理規範。

1.10 研究目標

1.10.1 臺大醫院 TSC REDCap 整合型資料庫的建立

有鑒於目前國際上現有的結節硬化症資料庫 Leiden Open source Variation Database (LOVD)，多來自國外的研究發表，國內結節硬化症患者的狀況，缺乏系統性的統整和管理。臺大結節硬化症門診從開辦以來，已有 508 位懷疑或確診是結節硬化症的病人及其家屬參與結節硬化症的研究。希望能將這些寶貴的臨床表徵和基因檢測資料加以統整，在臺大醫院的安全網域下，建立一個線上的 REDCap 結節硬化症整合型資料庫，成為未來研究或診斷參考的依據。

有別於現有的國際 LOVD 資料庫，除了登錄各個病人基因檢測找到的變異點以外，另外納入病人的臨床症狀表現以及家族譜圖，也將各科醫師定期追蹤病人的肺部、腹部、心理行為等所留下的紀錄，一併納入資料庫中。讓我們未來能更容易做各方面的整合比對，對結節硬化症能有更全面性的研究和了解



1.10.2 結節硬化症患者基因檢測上難解的問題

目前對結節硬化症病人做基因檢測，仍有 10~25%找不到致病變異點，根據過去文獻，其中主要有可能是屬於鑲嵌型或剪接位變異的病人[12]。鑲嵌型的病人，因周邊血液中含的致病變異點比例太低，在次世代定序結果判讀時，易被當成雜訊而忽略。希望能找到一個方法提高低比例鑲嵌型病人的致病變異基因檢出率。另一種是屬於隱藏在較深內涵子中，會影響基因剪接 (splicing) 的變異點。若找到懷疑的致病變異點，希望設計一個相應的功能性測試，實際確認此剪接位變異是否會造成剪接出來的 RNA 與正常的情況下有差異，以確認其致病性。

否則即使臨床上可以確診，若基因檢測無法提供致病的變異點，病人在計畫生育時，也無法藉由基因檢測防止下一代罹患相同的疾病。會造成結婚和生育的顧慮和壓力；若臨床診斷也未能確定，病人只能長期追蹤，無法確切知道如何看待自己的疾病狀況，容易追蹤疏失延誤病情的處置，也無法獲得診療費用的協助。

另外，如何確認同一患者身上兩個致病變異點在染色體上的相位關係，在次世代定序基因檢測上也是一個挑戰。若一人同時帶有兩種疾病的致病變異點，且恰好兩基因位在同一條染色體上，如果要生育下一代，兩變異點的相位關係就顯得重要，會直接影響病人的疾病會如何遺傳給後代，對於遺傳諮詢是必須了解的資訊。

最後，希望就現有收集到的結節硬化症病人的病灶檢體來探討 second hit 存在的狀況，以及 second hit 是以什麼樣的角色影響著結節硬化症病人在病灶上的進程發展。



第二章 研究方法

2.1 研究對象

2.1.1 受試者來源與收案標準：

曾懷疑是結節硬化症，且於臺大醫院結節硬化症整合門診看診的病人中：

(1)同意參與研究提供之 TSC 相關基因檢測的病人及其家屬

邀請加入通過台大倫理委員會審核的研究：「201104026RB 結節硬化症之基因體學、蛋白質體學及代謝體學研究 (Genomics, proteomics and metabolomics study of tuberous sclerosis complex (TSC))」。

共有 146 個家族 (TF001-TF146)，含 424 位 (TSC001-TSC424) 受試者。其中 3 個家族共 6 個人中途離開研究，故最終實際進行研究的有 143 個家族，共 418 位受試者。經過臨床表徵評估後，有 117 個家族先證者 (proband) 被醫生判定為結節硬化症，有 26 個家族先證者 (proband)，被認為實際上非結節硬化症患者。

(2)同意臨床看診資料、基因檢測結果、相關追蹤檢查紀錄，登錄於 TSC REDCap 資料庫以進行研究整合分析的病人或其家屬

邀請加入通過台大倫理委員會審核的研究：「201801015RIND 建立結節硬化症之整合型資料庫 Establishment of an Integrated Database of Tuberous Sclerosis Complex (TSC)」。

共有 224 個家族 (TTF00001-TTF00224)，含 514 位 (TTSC001-TTSC514) 受試者。其中 2 個家族共 6 個人中途離開研究，故最終實際納入資料庫研究的有 222 個家族，共 508 位受試者。經過臨床表徵評估後，有 168 個家族先證者 (proband) 被醫生判定為結節硬化症；10 個家族先證者 (proband)，尚未能確認是否為結節硬化症患者；44 個家族先證者 (proband)，被認為實際上非結節硬化症患者。

2.1.2 同意書簽署

被邀請加入「201104026RB 結節硬化症之基因體學、蛋白質體學及代謝體學研究 Genomics, proteomics and metabolomics study of tuberous sclerosis complex (TSC)」以及被邀請加入「201801015RIND 建立結節硬化症之整合型資料庫 Establishment of an Integrated Database of Tuberous Sclerosis Complex (TSC)」的受試者，各會簽署該研究的一份符合台大倫理委員會規範之「國立台灣大學醫學院附設醫院臨床試驗/研究受試者說明及同意書」。

若年紀在 12 歲以上不滿 20 歲的受試者，上述同意書除了受試者本人簽屬之外，需同時獲得法定代理人的同意及簽名；若年紀滿 7 歲以上不滿 12 歲的受試者，上述同意書需法定代理人的同意及簽名，而受試者本人簽屬額外提供的兒童版的同意書，具注音標示且文句較淺顯易懂，以確保兒童理解所進行研究的權益；若受試者不滿 7 歲，或者受試者本身具認知障礙，則需經由法定代理人的同意及簽名，始得納入研究。



2.1.3 檢體

(1)周邊血液

抽取受試者週邊血液 10 ml，於 2 管 EDTA 紫頭管。放於室溫馬上處理或置於 4 度冰箱 2~3 天內完成 DNA 的萃取。

(2)皮膚病灶組織

由皮膚科醫師常規手術切除病灶如：臉部血管纖維瘤或手腳趾甲週邊的纖維瘤組織，裝於放有生理食鹽水中的離心管中，暫冰於 4 度冰箱一天內馬上處理，或者倒掉生理食鹽水冰於-20 度冰箱，於一個月內完成 DNA 的萃取。

(3)福馬林/石蠟包埋組織切片 (formalin-fixed para-embedded, FFPE)

向臺大病理部申請病人手術切除的 HCC (hepatocellular carcinoma) 肝臟腫瘤組織 1.3 x 0.1 x 0.1cm，經由福馬林固定和蠟塊包埋後，取厚度 10um 的組織切片共 4 捲，萃取 DNA。

2.2 研究方法

2.2.1 DNA 萃取

(1)周邊血液白血球 DNA 萃取

使用 QIAgene Gentra Puregene Blood Kit 來萃取 EDTA 管周邊血液中白血球的 DNA。首先將採完血的採血管離心，取中間白血球層 (buffy coat)，放入 5ml RBC Lysis Solution 溶解摻混到的紅血球，接著離心去除上層液，留下的細胞即為白血球沉澱物。將白血球沉澱物打散後，加入 3ml Cell Lysis Solution，溶解白血球外層的蛋白質等物質，再加入 1ml Protein Precipitation Solution 將溶出的蛋白質沉澱出來。離心後留下上層液，加入等體積 Isopropanol，讓白色 DNA 核酸析出。撈起 DNA 放入 eppendorf，以 500 μ L 70%酒精清洗兩次後烘乾，再加入 400 μ L 10 mM Tris buffer 置於 65°C dry bath 1 小時溶解 DNA，即完成周邊血液的白血球 DNA 萃取。



(2)皮膚病灶組織的 DNA 萃取

病人經手術切下的皮膚病灶檢體，裝於放有生理食鹽水的離心管，離心去除生理食鹽水。將檢體置於培養皿上以刀子盡量切碎後，放入乾淨的離心管，加入 3ml Cell lysis solution 及 15 μ l Puregene Proteinase K 混勻，置於 56°C 水浴槽中作用，待 14-16 小時後檢體完全溶解呈透明膠狀或水狀。再加入 15 μ l RNase A solution，混勻後置於 37°C 水浴槽作用 15 分鐘。加入 1ml Protein Precipitation 混勻後離心留下上層液，再加入 4ml Isopropanol，可見白色核酸析出。將上述含核酸的溶液以每次 1ml 分次轉移入一個乾淨的 eppendorf，以高速離心機離心去除上清液，如此重複，最後可見 eppendorf 底部管壁有白色沉澱物，再以 500 μ l 75%酒精重複清洗兩次，離心倒掉上清液後烘乾，最後加入 30-60 μ l Tris buffer，置於 Dry bath 2 小時溶解 DNA，即完成皮膚病灶細胞的 DNA 萃取。

(3)福馬林/石蠟包埋組織 (formalin-fixed para-embedded, FFPE) 的 DNA 萃取

利用 truXTRACT™ FFPE DNA microTUBE Kit (Column Purification) 進行 DNA 萃取：利用 Covaris Adaptive Focused Acoustics (AFA™) 技術去除石蠟並使組織重新獲得水分；接著加入 20 μ l proteinase K 於 56°C 下作用 1 小時（視組織大小調整作用時間）去除蛋白質；再於 80°C 下乾浴槽作用 1 小時，去除福馬林造成的 DNA-蛋白質聯結；之後再利用聚焦超聲波裝置 (M220 Focused-ultrasonicator™) 將 DNA 打碎成約 350bp 長的片段；最後再以 NEBNext FFPE DNA Repair Mix 於 20°C 下作用 15 分鐘進行 DNA 的修復。

2.2.2 偵測 DNA 品質

使用 Nanodrop 2000 spectrophotometer，取 1.25 μ l 溶解均勻的 DNA，在核酸 (Nucleic Acid) 模式下，偵測波長 230nm（有機鹽類）、260nm（核酸）、280nm 的吸光值（蛋白質），得知 260/280 比值（核酸純度）、260/230 比值（殘留鹽類）、核酸濃度。260/280 介於 1.8~2.0 代表核酸純度高；260/230 介於 1.8~2.2 表示純化過程殘留鹽類較少。接著使用 1% 洋菜凝膠進行電泳，確認 DNA 的大小



與完整性。

2.2.3 TSC panel

涵蓋 mTOR 路徑中，上下游相關基因，共 29 個。其中 4 個基因設計的探針涵蓋整個基因全長：包含結節硬化症的主要致病基因 *TSC1* 和 *TSC2*；以及緊鄰於 *TSC2* 下游的 *PKD1* 基因，多次被報導和 *TSC2* 一併發生缺失，造成 TSC2-PKD1 contiguous gene syndrome [31, 32]；另外是會造成 Birt-Hogg-Dubé syndrome 的 *FLCN* 基因，因臨床症狀與結節硬化症類似，有時會被誤認為是結節硬化症的病人[33]。另外的 25 個基因，是過去文獻報導過位於 mTOR 路徑上下游的基因 [34]，或者曾被懷疑可能是造成結節硬化症致病的第三個候選基因[12, 35]，都一併納入此 TSC panel。以 Roche NimbleGene 探針設計，可涵蓋目標定序區域 (0.5Mb) 的 93.1% (表二) (附錄三)。

表二、TSC NGS panel

4 個基因 (整個基因範圍+上下游)				
<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>	<i>PKD1</i>	<i>FLCN</i>	
以上 4 個基因包含整個基因全部區域，以及：				
<i>TSC1</i> 上游 50kb 以內，下游 20kb 以內				
<i>TSC2</i> 上游 50kb 以內，下游接 <i>PKD1</i> ，到 <i>PKD1</i> 上游 10kb 以內				
<i>FLCN</i> 上游 20kb 以內，下游 10kb 以內				
25 個基因 (所有外顯子區域+上下游)				
<i>MTOR</i>	<i>PRKAA2</i>	<i>IRS1</i>	<i>PLD1</i>	<i>GSK3B</i>
<i>NPRL2</i>	<i>RICTOR</i>	<i>TBC1D7</i>	<i>PKHD1</i>	<i>RHEB</i>
<i>DEPTOR</i>	<i>MAPKAP1</i>	<i>PTEN</i>	<i>DDIT4</i>	<i>NPRL3</i>
<i>RPTOR</i>	<i>RPS6KB1</i>	<i>AKT1S1</i>	<i>FKBP8</i>	<i>FKBP1A</i>
<i>PKD2</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PRR5</i>	<i>MLST8</i>	<i>DEPDC5</i>
以上 25 個基因包含其所有外顯子區域，以及各外顯子上下游 50bp 內的位置				

2.2.4 次世代定序 (next-generation sequencing, NGS)

次世代定序為一種大量平行的定序方式 (Massively Parallel Sequencing, MPS)，可同時進行大量不同核酸檢體來源的短片段定序，達成高速及高通量的效果[36]。本研究利用 Illumina 的 Miseq 儀器進行核酸次世代定序。主要流程可分為以下步驟：

(1) 核酸片段化 (fragmentation) 與建庫 (library construction)

首先利用 Qubit 2.0 螢光分析儀偵測 DNA 的含量，調成適當濃度；以 Covaris DNA 超聲波斷裂儀將 genomic DNA 打碎成約 800bp 的黏狀末端 (sticky end) 片段。使用 Illumina TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit，將片段末端不完整處以 End Repair Mix 作用進行修復，並形成平滑末端 (blunt-end)，同時將 DNA 片段 5'端磷酸化；再用磁珠 (Sample Purification Beads) 篩去過長和過短的片段；接著用 A-Tailing Mix 作用，將 DNA 片段 3'端加上一個腺嘌呤 (adenylate, A)，提供後續和接頭 (adapter) 3'端的 T 互補的核酸，以利接合 (ligation) 的進行。

接著利用 DNA 接合酶 (ligase) 於片段兩頭接上接頭 (adapter)、索引 (index)、P5 和 P7，接頭 (adapter) 是一段可以讓定序引子 (primer) 結合的序列，索引 (index) 為用來區分不同檢體來源的標示，P5 和 P7 做為讓 DNA 片段附著到 Miseq 流動池 (flow cell) 表面的媒介。

(2) 捕捉目標基因區域的片段進行擴增 (capture-based target enrichment) 並定序

針對 TSC panel 中欲定序的基因區域，設計相應的 Roche NimbleGene 探針 (probe) 捕捉含有這些基因區域之 DNA 片段，以 Illumina 的 Miseq system 進行定序。使用 Illumina MiSeq Reagent Kit v3.，單股 DNA 片段之 P5 或 P7 端隨機和流動池 (flow cell) 表面的 P7 或 P5 互補結合，並以橋式聚合酶鏈鎖反應 (bridge PCR) 進行擴增，形成叢集 (cluster)。

定序引子 (primer) 和接頭 (adapter) 結合，在 DNA 合成酶作用下，在合成的同時也進行雙端 (paired-end) 定序。帶有不同螢光的四種鹼基 (dNTPs) 依互補

原則結合上，反覆進行螢光標記的偵測與移除 (fluorescently labeled reversible terminator)，達到大量定序的目的。



(3) 定序資料輸出與分析

Miseq 定序輸出的原始數據為 FASTQ 檔案 (R1 fastq.gz 和 R2 fastq.gz)，需利用 BWA 軟體[37]將數據比對回貼到人類基因體參考序列 (GRCh37/hg19)，輸出資料為 SAM 檔，帶有每個片段被回貼到人類基因體參考序列哪個位置的訊息；利用 Picard 和 GATK 軟體將 SAM 檔轉換成電腦可處理的 bam 檔，再利用 GATK Haplotype 軟體標示出和參考序列不同的變異點位置，並把低於 10%變異點當做定序背景雜訊而刪除，資料輸出成 VCF 檔；最後利用 ANNOVAR 軟體判定變異點位置落在哪一個基因上，輸出成 TXT 檔。從所有在 TXT 檔的變異點中，評估哪些變異點可能具致病性，同時也搭配可圖示化 bam 檔的 Integrative Genomics Viewer (IGV) 軟體檢視定序資料。

2.2.5 變異點致病性的判讀

2.2.5.1 結節硬化症資料庫 (Leiden Open source Variation Database, LOVD)

Tuberous sclerosis database-TSC1:

http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC1

Tuberous sclerosis database-TSC2:

http://chromium.liacs.nl/LOVD2/TSC/home.php?select_db=TSC2

2.2.5.2 變異點致病性的預測軟體

利用 SIFT[16, 17]、polyphen-2[18, 19]軟體，預測錯異變異點 (missense variant) 的致病性；利用 Human Splicing Finder (HSF) 軟體[20]，預測剪接位變異 (splicing site variant) 的是否會影響基因剪接功能。

2.2.5.3 變異點致病性的綜合判讀準則

依據 The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) 準則



[38]，將找到的變異點根據：其變異類型是否會造成蛋白沒有辦法被完整製造出來、過去是否有文獻報導過會造成同位置相同胺基酸變化的致病變異、是否是正常父母皆不帶有的新發生突變、過去是否有針對此點位的功能性測試、在結節硬化症人群中此變異點存在的比率是否比在正常人群中存在的比率還高、同家族中多位患有結節硬化症身上是否都帶有此變異點、變異點致病性預測軟體的結果……等，將變異點分為：致病性 (pathogenic)、高度懷疑致病 (likely pathogenic)、臨床意義不明 (variant of unknown significance)、懷疑良性 (likely benign)、良性 (benign)。

2.2.6 聚合酶連鎖反應(PCR)及傳統定序 (sanger sequencing)

次世代定序基因檢測若找到懷疑致病的變異位點：點突變 (SNV)、小片段插入或缺失，會針對此區域設計相應的引子 (primer)，利用 Promega GoTag Green Master Mix 和 PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 進行聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，放大此區域片段，再經傳統桑格定序方式 (ABI PRISM BigDye Terminator) 進行確認[39] (附錄一)。

2.2.7 minigene assay

將待測的剪接位變異所在的外顯子，以及其前後一個外顯子的範圍區域，設計特殊的引子，利用 PCR 的方式，製造此範圍區域的 DNA 片段。將此目標 DNA 片段利用 Gibson assembly 的方式 clone 進 pcDNA3.1 vector 中，送入 DH5 α Competent Cells，經培養後，挑菌做 PCR 確認 insert DNA 有接進 vector，且送定序確認序列正確。並將產物分為兩組，其中一組利用 Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit 進行 mutagenesis，製造出欲測試的變異點位。接著萃取純化 plasmid，transfect 入 HEK293 細胞表現。最後再抽取 RNA，以 RT-PCR 翻轉回 DNA 序列，做定序，觀察帶有目標剪接位變異和不帶有目標剪接位變異的基因剪接產物

是否有異，來判定此剪接位變異是否具致病性（附錄一、附錄二） [26, 27] 。



2.2.8 REDCap 資料庫

在臺大醫學院的網路下建構結節硬化症 REDCap 資料庫，REDCap 是一個安全的網路應用平台，可用來建立與管理線上資料庫與問卷。提供自動化的程序，可搭配各種統計軟體格式 (Excel, SPSS, SAS ,Stata, R) 或連結其他外部應用程式，也可簡單產生個人化需求的報表，大批匯入或匯出資料。便於資料管理、備份和應用，也利於多人共同編輯、分享[40]。

2.2.9 PhenoTips 家族譜圖繪製

納入研究受試者及其家族時，用單機版的 PhenoTips 軟體統一繪製家族譜圖 (pedigree)。PhenoTips 可以多人共同編輯，且可隨著家族成員狀況做更動修改[41]。



第三章 研究結果

3.1 REDCap 資料庫

3.1.1 REDCap 表單及項目欄位

TSC REDCap 總共含有七大類表單，每一個表單之下又設有各相關子項目。

七大類表單包括：

(1) 受試者納入研究的基本資料 (TSC enrollment list)

此表單是紀錄受試者納入本研究案時，登錄的基本資料。包含個人基本資料、受試者及其家族的研究編號、結節硬化症診斷概要等。

Personal Information		Personal Background	
TTSC Number * 必填		籍貫	
TTF Family Number		之前主要居住地1	
TSC Number		之前主要居住地2	
TF Family Number		之前主要居住地3	
病歷號		父親家族 ☐ 原住民 ☐ 客家人 ☐ 約50年前才從大陸遷台 ☐ 閩南人 ☐ 其他，請描述	母親家族 ☐ 原住民 ☐ 客家人 ☐ 約50年前才從大陸遷台 ☐ 閩南人 ☐ 其他，請描述
身分證後三碼			
姓名尾字 * 必填			
Personal Demographic			
性別 * 必填	☐ 未知 ☐ 男性 ☐ 女性		
生日 * 必填	今天 M-D-Y		

Medical Information	
初診日期(第一次在台大醫院因結節硬化症看診)	今天 M-D-Y
是否為結節硬化症病人	☐ 確診 ☐ 疑似 ☐ 非 ☐ 未評估
被診斷為結節硬化症日期	今天 M-D-Y
與受試者本人關係 * 必填	
本身結節硬化症是否遺傳自父母:	☐ 否 ☐ 是
具備結節硬化症重大傷卡 * 必填	☐ 未知 ☐ 有 ☐ 無
基因檢測 * 必填	☐ 未做過基因檢測 ☐ 有做過基因檢測，有找到致病點 ☐ 有做過基因檢測，未找到致病點
結節硬化症確診結果(根據重卡+臨床症狀+基因檢測之結果) * 必填	☐ 無 ☐ 三者具其一 ☐ 三者具其二 ☐ 三者兼具

圖一、 REDCap database - TSC enrollment list

(2) 結節硬化症及相關疾病就醫紀錄 (medical history)

此表單紀錄受試者在來台大醫院就診之前，是否有結節硬化症相關的就醫紀錄。



Diagnostic

您被診斷為結節硬化症時的主要症狀為何?

Previous Medical Registry

除了在台大醫院就醫外，有無在其他醫院(不論是先前或是現在)就醫?

☐ 有
☐ 無
☐ 其他

Previous Genetic Diagnostic

您先前是否已經有明確的基因診斷?

☐ 有
☐ 沒有

其他疾病狀況

1. 是否為B型肝炎帶原者?

☐ 是
☐ 否
☐ 未知

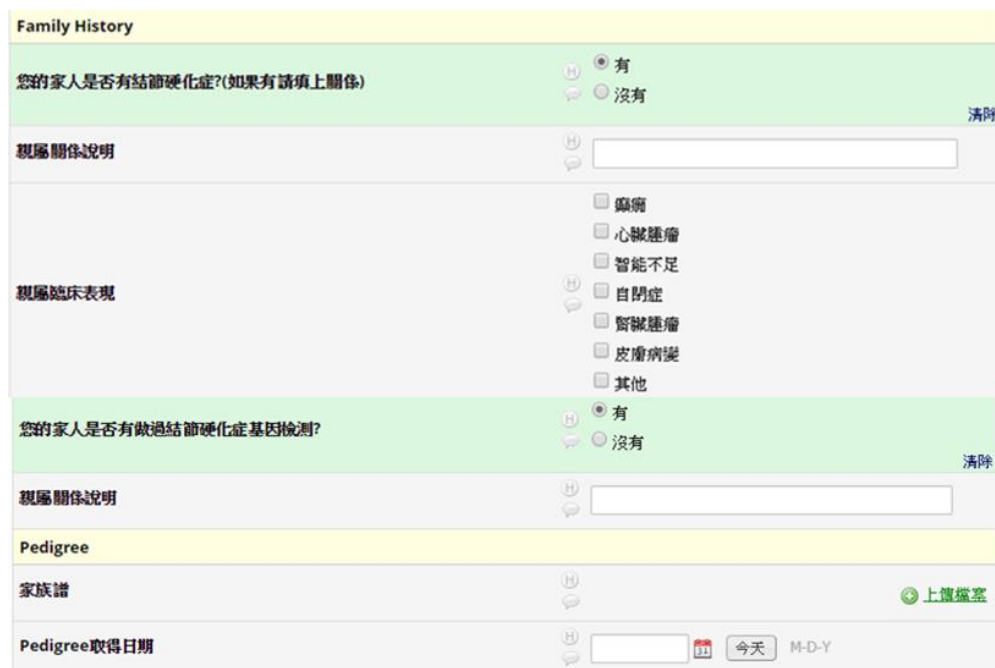
2. 是否為C型肝炎帶原者?

☐ 是
☐ 否
☐ 未知

圖二、 REDCap database - medical history

(3) 結節硬化症家族史 (family TSC history)

此表單紀錄受試者的家人是否有結節硬化症相關表徵，及是否做過相關基因檢測，並記錄受試者家族譜圖 (pedigree)。



Family History

您的家人是否有結節硬化症?(如果有請填上關係)

☒ 有
☐ 沒有

親屬關係說明

親屬臨床表現

☐ 癲癇
☐ 心臟腫瘤
☐ 智能不足
☐ 自閉症
☐ 腎臟腫瘤
☐ 皮膚病變
☐ 其他

您的家人是否有做過結節硬化症基因檢測?

☒ 有
☐ 沒有

親屬關係說明

Pedigree

家族譜

Pedigree取得日期

今天 M-D-Y

上傳檔案

圖三、 REDCap database - family TSC history



(4)教育程度及工作狀況 (education and occupation)

此表單紀錄受試者在各個階段的教育程度及工作狀況，可供評估受試者的智力發展和社會適應能力情形。

Education- 您接受教育資源為:	
就學狀況(目前最高學歷)	☐ 無 ☐ 幼兒園 ☐ 小學 ☐ 國中 ☐ 高中 (職) ☐ 專科 ☐ 大學 ☐ 研究所以上 清除
就讀縣市1	 清除
就讀學校1	 清除
就讀日期1	今天 M-D-Y
是否為資源班或特殊教育1	☐ 是 ☐ 否 清除
Occupation	
工作狀況(全職/兼職)1:	☒ 有 ☐ 沒有 清除
工作日期1	今天 M-D-Y
工作說明1	 展開
工作狀況(全職/兼職)2:	☐ 有 ☐ 沒有 清除

圖四、REDCap database - education and occupation



(5)臨床診斷 (clinical diagnosis)

包含各項結節硬化症臨床診斷標準中的 11 項主要表徵 (major feature) 和 6 項次要表徵 (minor feature) [8]，提供可以上傳圖檔紀錄以及文字描述的空間，並加上牙科、復健科、肺臟、肝臟、腎臟、神經各科別的專屬紀錄追蹤細項。

Clinical Diagnosis	
臨床診斷 Definite diagnosis: Two major features or one major feature with 2 minor features (Updated diagnostic criteria for tuberous sclerosis complex 2012)	☐ Unknown ☐ Definite ☐ Possible ☐ Not evaluated
Major Features	
1. 胎前血管纖維瘤或額頭斑塊 (3個以上) Facial angiofibroma or forehead plaque (>3)	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
2. 脫色斑 (直徑大於5mm，3個以上) Hypomelanotic macules (>3, at least 5-mm diameter)	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
3. 指甲 (邊) 纖維瘤 (2個以上) Ungal fibroma (>2)	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
4. 鯊魚皮斑 Shagreen patch	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
5. 多個視網膜粒狀絨毛瘤 Multiple retinal hamartomas	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
6. 腦皮質結節# Cortical dysplasias#	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
#Includes tubers and cerebral white matter radial migration lines.	
上傳圖檔1	
7. 腦室管下結節 Subependymal nodule	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
8. 腦室管下巨細胞星狀瘤 Subependymal giant cell astrocytoma, SEGA	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
9. 心臟紋肌瘤 Cardiac rhabdomyoma	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
上傳圖檔1	
10. 淋巴管肌瘤增生* Lymphangiomyomatosis, LAM*	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
*A combination of the two major clinical features (LAM and angiomyolipomas) without other features does not meet criteria for a definite diagnosis.	
上傳圖檔1	
11. 腎血管肌脂肪瘤* (2個以上) Renal angiomyolipoma* (>2)	☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定
*A combination of the two major clinical features (LAM and angiomyolipomas) without other features does not meet criteria for a definite diagnosis.	
上傳圖檔1	

圖五、REDCap database - clinical diagnosis - major feature

Minor Features

1. 斑駁皮膚病 (Confetti skin lesions) ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

2. 牙齒琺瑯質坑 (3個以上) (Dental enamel pits (>3)) ☐ 未知 ☒ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

檢查日期1 [今天](#) M-D-Y

個數

請描述

展開

上傳影像1 [上傳檔案](#)

3. 口腔內纖維瘤 (2個以上) (Intraoral fibromas (>2)) ☐ 未知 ☒ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

檢查日期1 [今天](#) M-D-Y

個數

請描述

展開

上傳影像1 [上傳檔案](#)

4. 視網膜無色斑 (2個以上) (Retinal achromic patch (>2)) ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

5. 多個腎囊腫 (Multiple renal cysts) ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

6. 非腎質位瘤 (Non-renal hamartoma) ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

圖六、REDCap database - clinical diagnosis - minor feature

行為 Behavior

1. 自閉特質 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

2. 過動 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

3. 情緒行為障礙 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

4. 學習障礙 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

5. 其他

展開

上傳影像1 [上傳檔案](#)

心智

1. 心智發展 ☐ 正常 ☐ 中下 ☐ 臨界 ☐ 輕度 ☐ 中度 ☐ 重度 [清除](#)

請描述

展開

上傳影像1 [上傳檔案](#)

檢測日期1 [今天](#) M-D-Y

測驗名稱1

FIQ-1

說明1

發展史

1. 遲緩 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

2. 第一次說單字年齡

上傳影像1 [上傳檔案](#)

3. 第一次說句子年齡

上傳影像1 [上傳檔案](#)

4. 有無接受治療 ☐ 未知 ☐ 符合 ☐ 不符合 ☐ 無法判定 [清除](#)

上傳影像1 [上傳檔案](#)

圖七、REDCap database - clinical diagnosis - 復健科

肺臟 Lung

1. 多發性肺泡腫脹增生現象
Multifocal Micronodular Pneumocyte Hyperplasia

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

2. Pulmonary function test (肺功能)

☐ 無
☒ 有

清除

檢測日期1

05-15-20
今天
M-D-Y

FEV1:

% predicted FEV1:

FVC:

% predicted FVC:

TLC:

% predicted TLC:

DLCO:

% predicted DLCO:

VA:

檢測日期2

今天
M-D-Y

3. Chest CT(胸部電腦斷層)

☐ 無
☒ 有

清除

檢測日期1

05-15-2018
今天
M-D-Y

Cyst:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

Cyst_上傳影像

上傳檔案

MMPH:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

MMPH_上傳影像

上傳檔案

GGO:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

GGO_上傳影像

上傳檔案

Mass:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

Mass_上傳影像

上傳檔案

Chylothorax:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

Chylothorax_上傳影像

上傳檔案

Pneumothorax:

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

Pneumothorax_上傳影像

上傳檔案

檢測日期2

今天
M-D-Y

肝臟 Liver

1. Hepatic AML

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

2. Hepatic Harmoratoma

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

3. Hepatic Cyst

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

腎臟 Kidney

1. Renal AML Class

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

2. Renal Harmoratoma

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

3. Renal Intratumoral Aneurysm

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

4. Renal Hemorrhage

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

5. Renal Cyst Class

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

上傳影像1

上傳檔案

6. Retroperitoneal LAM

☐ 未知
☐ 符合
☐ 不符合
☐ 無法判定

清除

圖八、REDCap database - clinical diagnosis - 胸腔科及肝臟、腎臟科

圖九、REDCap database - clinical diagnosis - 神經科

(6)臨床表現症狀 (clinical symptoms)

做為受試者一開始納入研究時的問卷調查表單，整體性地了解受試者的臨床表現。

圖十、REDCap database - clinical symptoms



(7)基因檢測結果 (genetic testing)

記錄受試者納入本研究後，以次世代定序的方式做出的基因檢測結果。若已知家族致病點位，則直接以桑格定序針對特定點位作確認。或受試者已在外面做過基因檢測且不重覆進行，則直接記錄其點位。

Genetic Testing 1

新增 Record ID 515

Record ID 515

Genetic Testing Result (周邊血液)

採檢日期 今天 M-D-Y

報告日期 今天 M-D-Y

基因檢測結果 (是否找到變異點) ☒ 有 ☐ 沒有 ☐ 未知 清除

基因檢測結果判讀 ☐ Pathogenic ☐ Likely Pathogenic ☐ Variant of unknown significant ☐ Likely Benign ☐ Benign ☐ Others 清除

基因檢測方法 清除

基因名稱 TSC1 ☐ TSC2 ☐ FLCN ☐ 其他 清除

NM number 清除

變異位置(LOVD) ☐ Intron ☐ Exon ☐ Promoter ☐ 5' UTR ☐ 3' UTR ☐ 其它，請說明 清除

de novo ☐ 是 ☐ 否 ☐ 未知 清除

Intron/Exon number

Nucleic acid change

Amino acid change

Variation Type ☐ frameshift indel ☐ inframe indel ☐ splicing site ☐ stop gain ☐ missense ☐ large deletion ☐ large duplication ☐ inversion ☐ translocation ☐ other, please describe 清除

zygosity ☐ homozygosity ☐ heterozygosity ☐ mosaicism ☐ other, please describe

cosegregation

SIFT score 展開

PolyPhen-2 score 展開

Human Splicing Finder(HSF)

其他類型檢體確認 ☐ 無 ☐ 皮膚 ☐ 其他 清除

報告編號1 上傳檔案

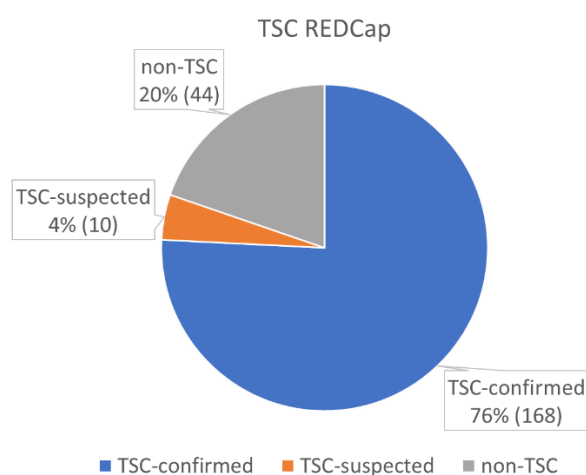
圖十一、REDCap database - genetic testing



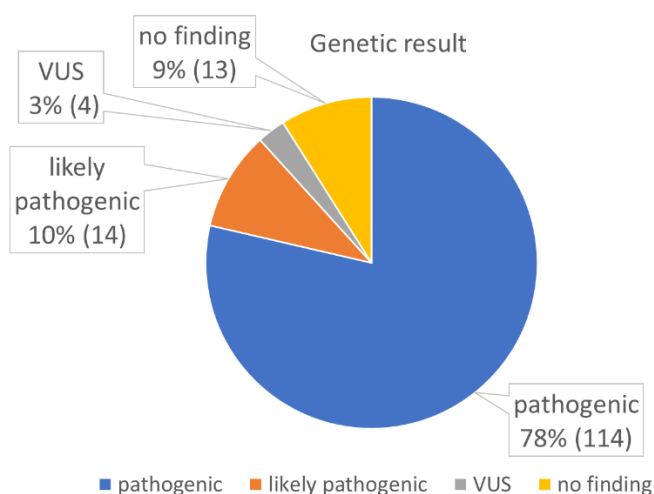
3.1.2 臺大醫院結節硬化症整合門診病人的基因檢測結果統計

總共納入 222 個家族，其中有 168 個家族臨床確診為結節硬化症；10 個家族臨床懷疑為結節硬化症但尚不足以確診；44 個家族原本被懷疑是結節硬化症，經過轉介來臺大醫院評估後認為非結節硬化症（圖十二）。

此 168 個臨床確診為結節硬化症的家族中，有 23 個家族選擇不做基因檢測，剩下的 145 個家族都進行次世代定序基因檢測。有 88% 的家族有在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因上找到確定或高度懷疑致病的變異點；3% 的家族有在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因上找到變異點，但尚無法確認其致病性；9% 的家族在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因上均沒有找到任何懷疑致病的變異點（圖十三）（附錄四）。

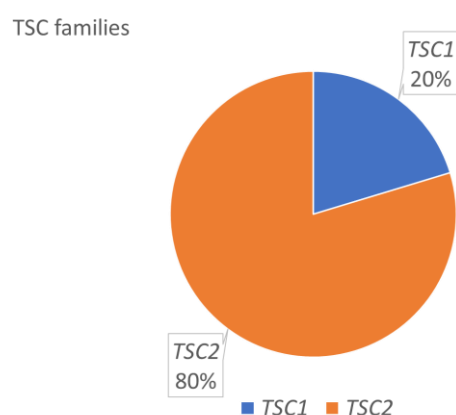


圖十二、受試 222 個家族 TSC 臨床診斷結果

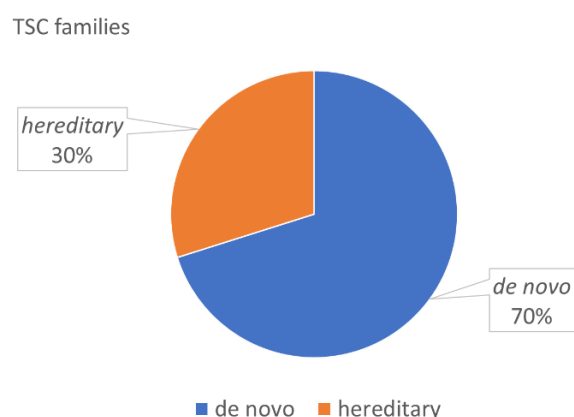


圖十三、145 個家族進行基因檢測的結果

在 88% 有在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因上找到確定或高度懷疑致病變異點的家庭中，20% 的致病變異點位在 *TSC1* 基因，80% 的致病變異點位在 *TSC2*（圖十四）。約 30% 的致病變異點是從父母遺傳而來，70% 的結節硬化症病患是自發性產生的致病變異點（圖十五）。

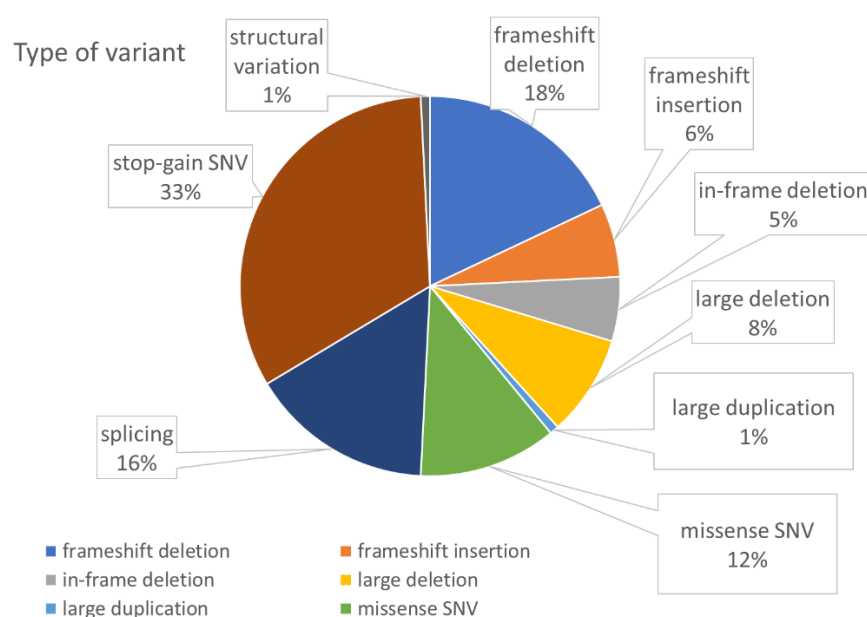


圖十四、受試家族 *TSC1* 和 *TSC2* 的比例

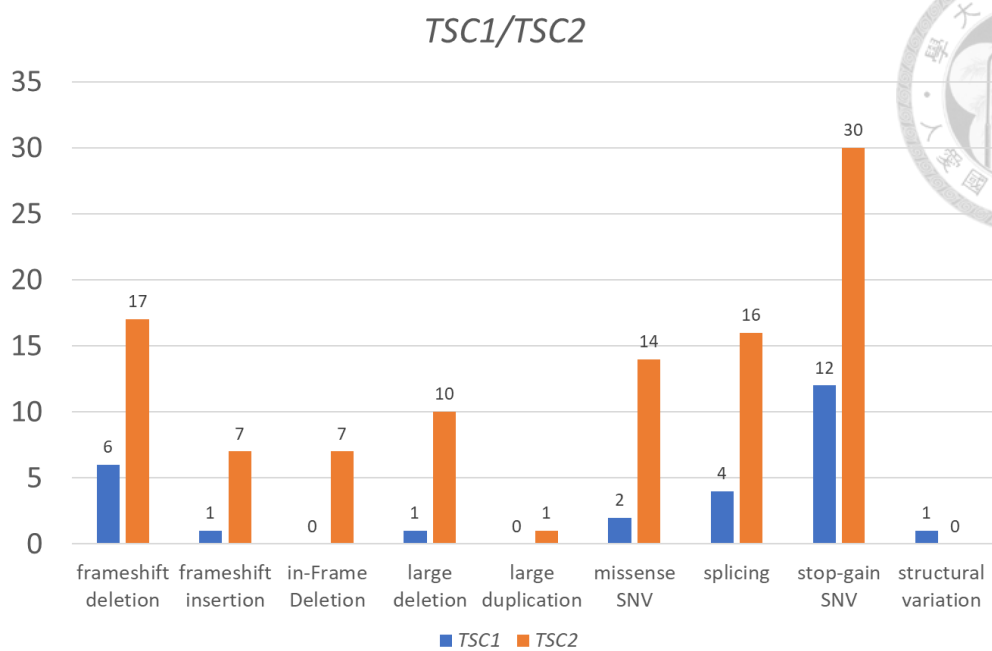


圖十五、TSC proband 遺傳/偶發比例

基因變異點各類型的分佈比例，以造成終止密碼子提前產生的變異點 (stop-gain SNV) 佔的比例最高 (32%)，其次是造成移碼的小片段刪除 (17%)、剪接位變異 (16%)（圖十六、圖十七）。



圖十六、基因變異點各類型的分佈比例



圖十七、基因變異類型分類中，在 *TSC1* 或 *TSC2* 基因的分佈比例。

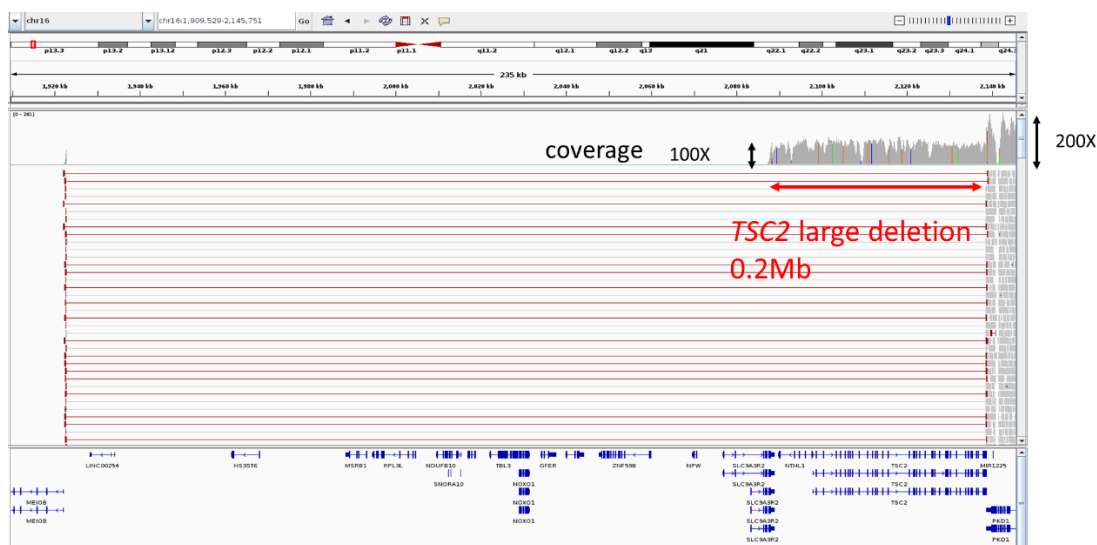


3-2 結節硬化症患者基因檢測上難解的問題

3-2-1 確認同一患者身上兩個致病變異點在染色體上的相位關係

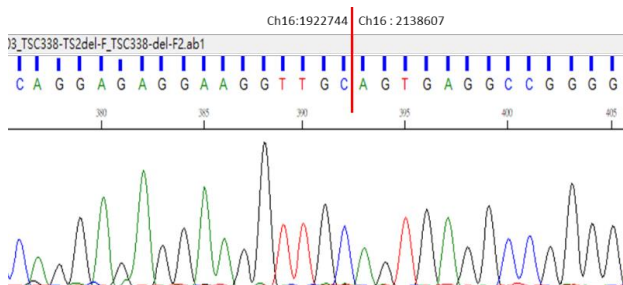
TSC338 於 2014 年加入研究，進行次世代定序基因檢測，發現此個案同時帶有 *TSC2* 基因約 0.2 Mb 的大片段缺失（圖十八）以及 *PKD1* 基因帶有一個 SNP 變異導致終止密碼子提前出現（圖二十、圖二十一），使兩基因皆失去功能。

(1) *TSC2* 基因約 0.2 Mb 大片段缺失



圖十八、TSC338 之 *TSC2* 基因次世代定序檢測結果- *TSC2* 約 0.2 Mb 大片段缺失

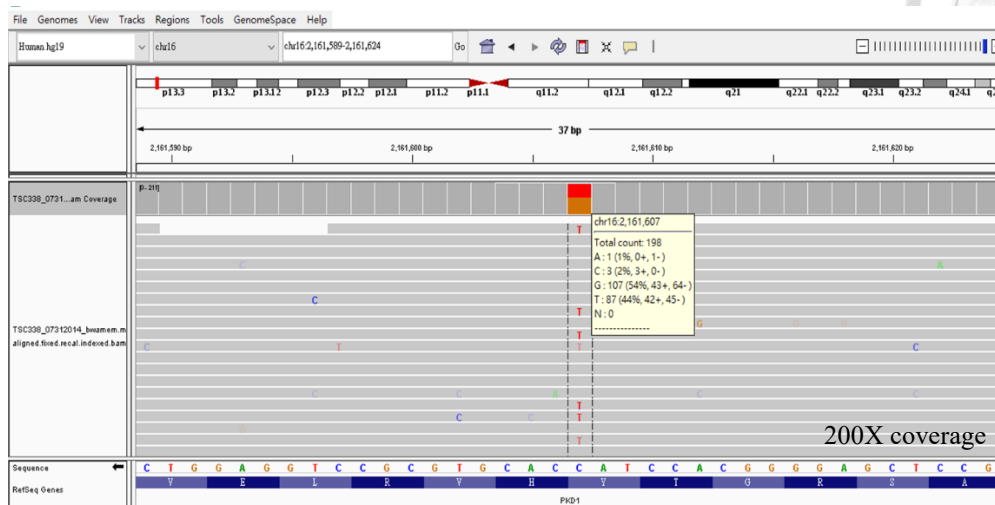
由 IGV 軟體上可見 *TSC2* 基因的定序深度從平均約 200 倍降為 100 倍，可見此區域有大片段的缺失。針對 IGV 圖上看到的前後斷點，設計一組引子（附錄一），若個案的染色體上帶有此大片段缺失，則可以經由 PCR 產生一產物，並可經由桑格定序出來。由定序出的序列可確定此大片段缺失的範圍為第 16 號染色體 192227745 至 2138606 的位置，總共有 215862 個核酸缺失（圖十九）。



圖十九、TSC338 之 *TSC2* 基因桑格定序檢測結果- *TSC2* 共有 215862 個核酸缺失

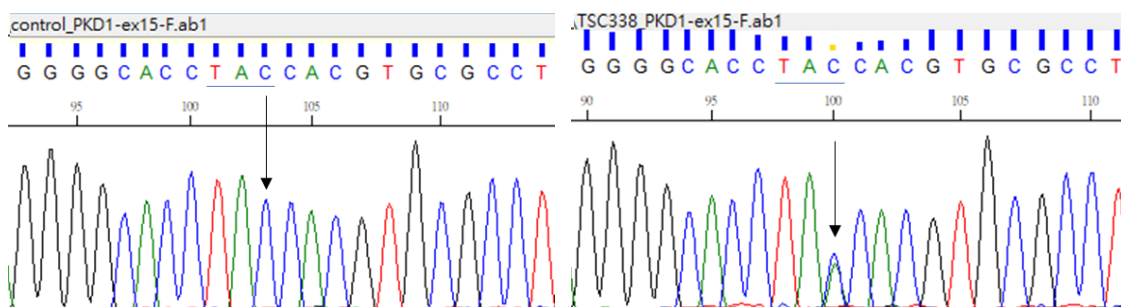


(2) *PKD1* 基因變異導致終止密碼子提前出現



圖二十、TSC338 之 *PKD1* 基因次世代定序檢測結果-*PKD1* (NM_000296) ex15

c.3561C>A; p.Y1187X



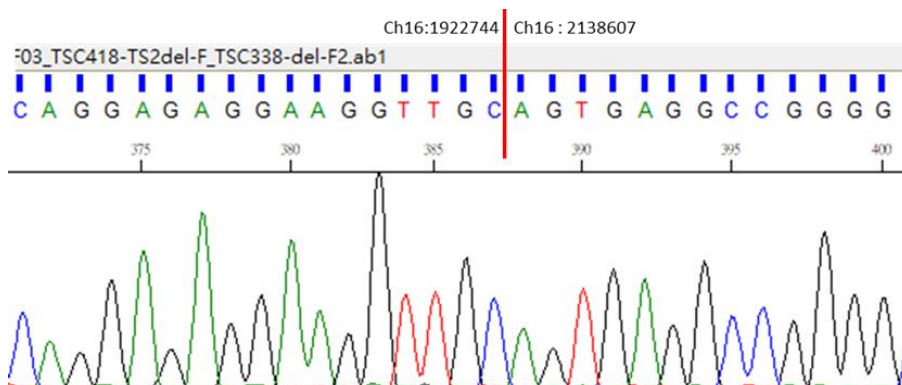
圖二十一、TSC338 之 *PKD1* 基因桑格定序檢測結果- *PKD1* (NM_000296) ex15

c.3561C>A; p.Y1187X

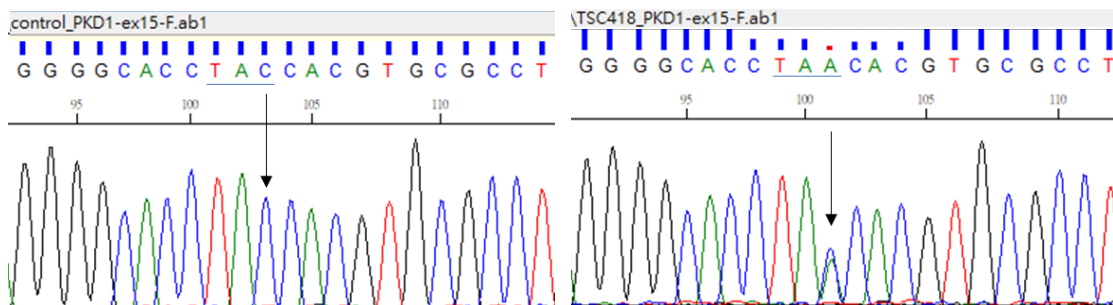
當初因為 NGS 方法上的限制，無法確切釐清 TSC338 帶有的兩個致病變異位置之相位狀況 (haplotype)，因為 *TSC2* 和 *PKD1* 基因皆位於第 16 號染色體上，且兩個變異位置之間的距離過長，無法藉由 NGS 定序片段 (read) 上帶有的其他 SNP 做推斷。如今 TSC338 的兒子 (TSC418) 也來做檢驗，即可釐清 TSC338 的兩個致病變異是否位於同條 16 號染色體上。若位於同條 16 號染色體上，則兒子 (TSC418) 理論上會同時遺傳到父親 (TSC338) 的兩個致病變異；反之，若位於

不同條 16 號染色體上，則兒子 (TSC418) 只會遺傳到其中一種致病變異。但也代表父親 (TSC338) 若想要再有一個後代，則必會遺傳到其中一種疾病。

將兒子 (TSC418) 周邊血液檢體針對此兩致病變異做桑格定序，確認皆和其父親 (TSC338) 相同，同時帶有此兩致病變異（圖二十二、圖二十三），也藉此確認這兩個基因變異是位於同一條 16 號染色體上。



圖二十二、TSC418 之 *TSC2* 基因桑格定序檢測結果- *TSC2* 有 215862 個核酸缺失



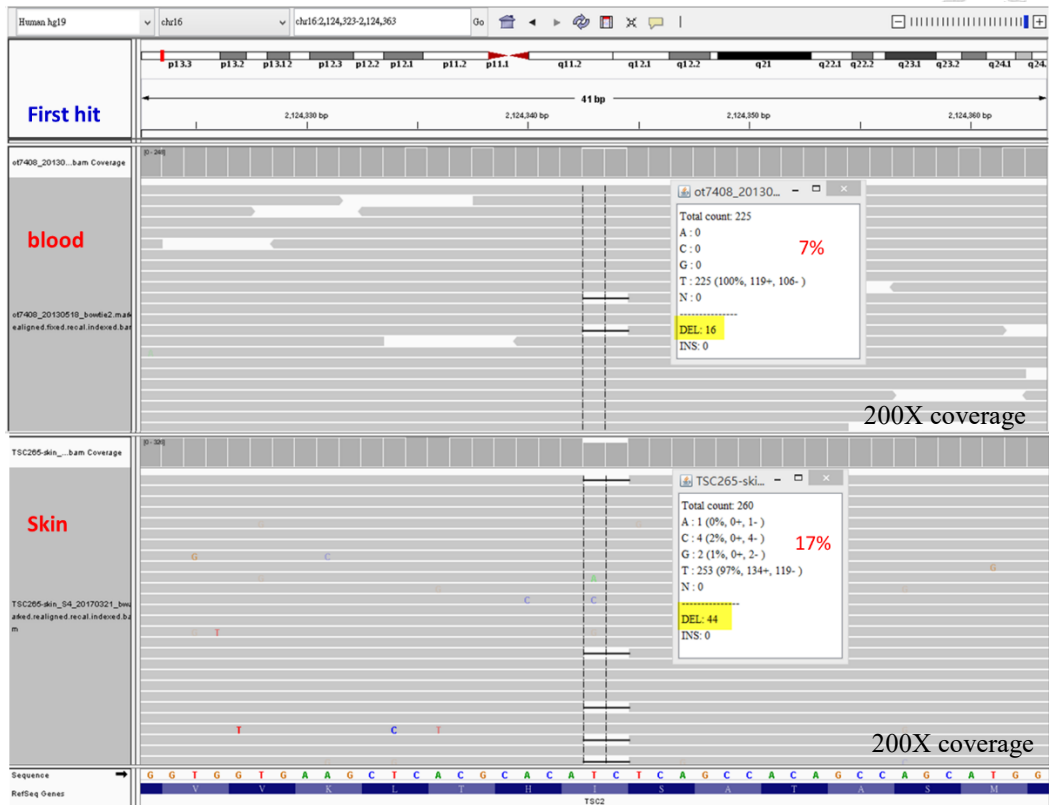
圖二十三、TSC418 之 *PKD1* 基因桑格定序檢測結果- *PKD1* (NM_000296) ex15
c.3561C>A; p.Y1187X

3-2-2 提升低比例 *TSC1* 或 *TSC2* 鑲嵌型患者的基因檢測檢出率

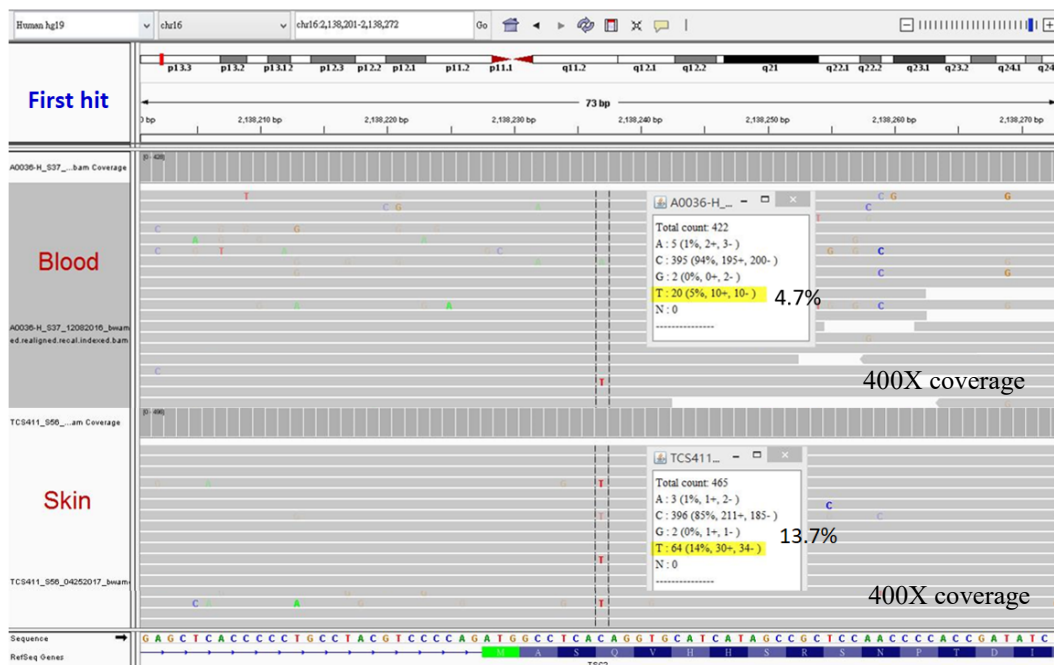
根據 two hits 理論[42]，我們預期在結節硬化症病人皮膚病灶的檢體中，找到除了病人當初基因檢測找到的生殖細胞突變 (first hit) 之外，可以再找到第二個體細胞突變 (second hit)。若患者屬於較低比例的生殖細胞變異鑲嵌型，導致判讀上被忽略，可以藉由檢測皮膚病灶的 DNA，先找到 second hit，而依據 second hit 所在的基因是 *TSC1* 或 *TSC2*，推估 first hit 也在同一基因上，藉此縮小尋找低比例鑲嵌型生殖細胞變異的範圍，提高低比例鑲嵌型病患的基因檢測檢出率。

但實際上我們將皮膚病灶檢體進行 NGS 後，並未發現 second hit，可能是取檢時沒有取到或者只含少量帶有 second hit 的 fibroblast-like 細胞[43]，但可以觀察到的是：皮膚檢體內含的 first hit 比例比周邊血液還要高[12]。可能是因為鑲嵌型患者身上所含帶致病點的細胞，在體內並非均勻分布，而是有些組織或器官帶有致病變異的比例較高，而有些正常細胞比率較高。而含致病變異點比率較高的組織或器官較易產生病灶，故取病灶組織周圍的細胞，其 first hit 的比例相較於周邊血液，可能是比較高的。

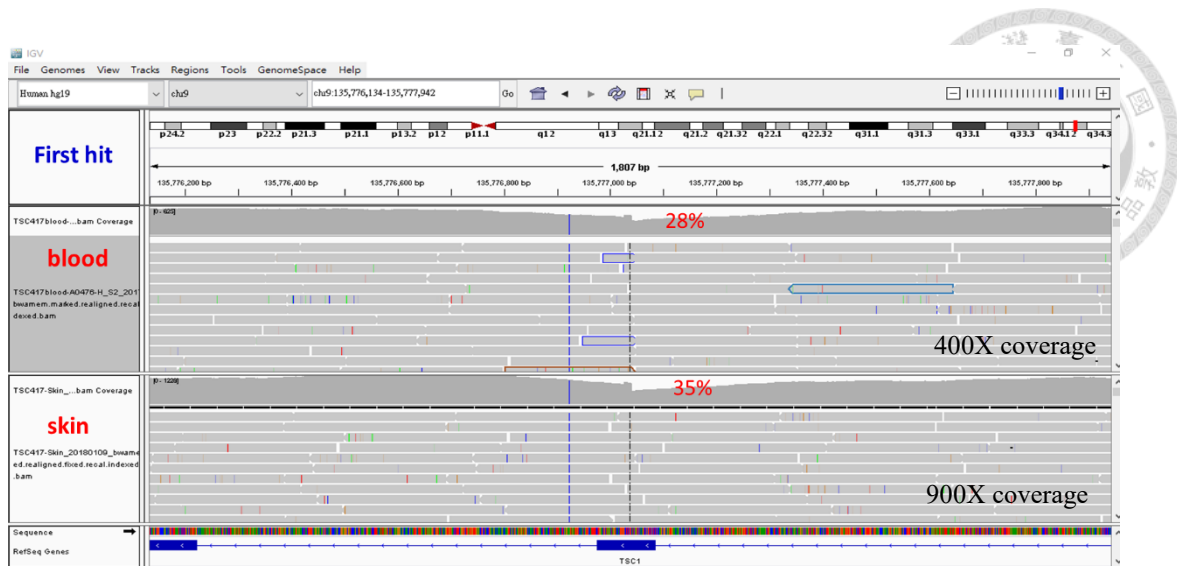
因為目前我們次世代定序出來的資料進行分析時，會將低於 10% 的變異訊號當作是背景雜訊而過濾掉。因此若鑲嵌型病人周邊血液的變異點比例低於 10%，或者較難在 IGV 軟體被確認的結構性異常，就會被忽略掉，變成沒有找到致病變異點的狀況，如在此描述的 TSC256 (7%)、TSC411 (4.7%)、TSC417 (28%)。而此 3 位病人的 first hit 皆在我們分析他們的皮膚病灶基因時，因含量比例提高至超過 10%：TSC256 (17%)、TSC411 (13.7%)，或者在 IGV 軟體檢視下使結構性異常較易被確認：TSC417 (35%)，使 first hit 意外地被發現（圖二十四、圖二十五、圖二十六）。



圖二十四、TSC265 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果- TSC2
(NM_000548) c.2498_2499del; p.I833fs [44]



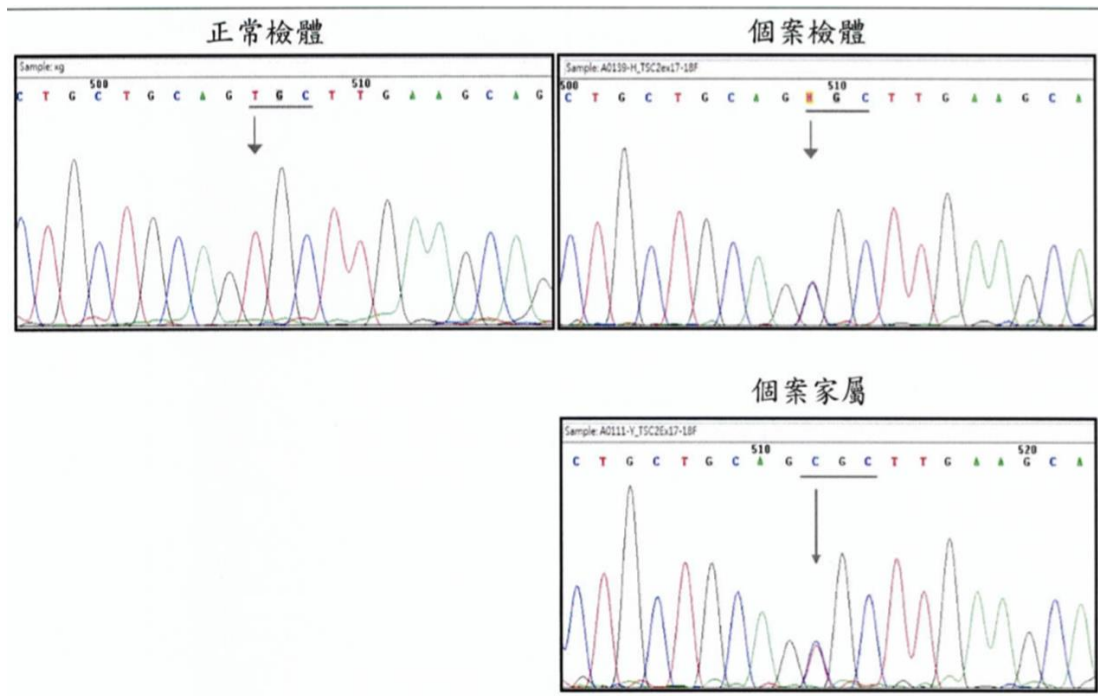
圖二十五、TSC411 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果-TSC2
(NM_000548): c.5170C>T; p.Gln1724* [44]



圖二十六、TSC417 的周邊血液及皮膚病灶次世代定序檢測結果-TSC1 ex19 (NM_000368) 結構性異常

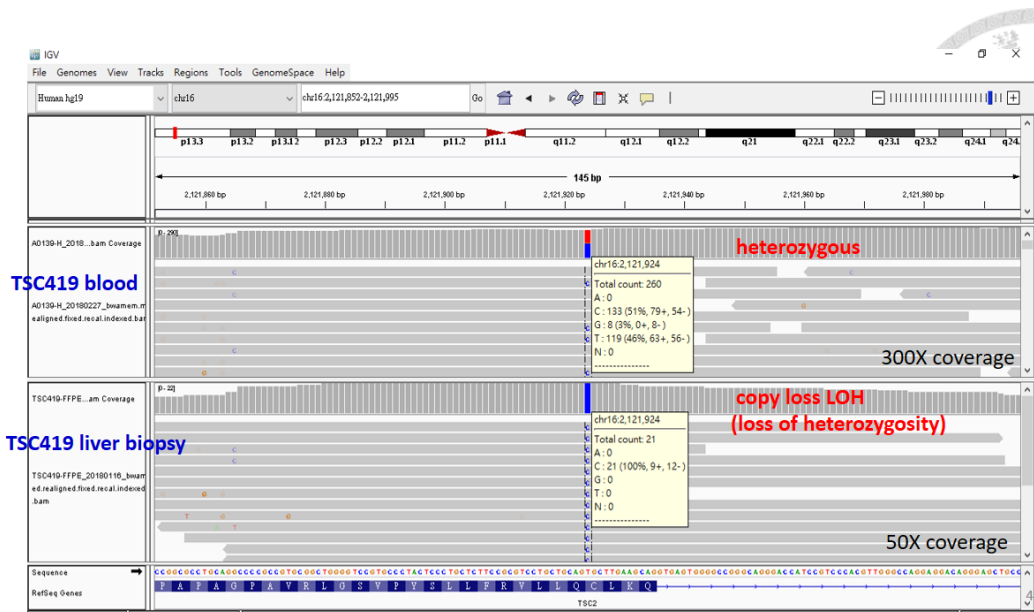
3-2-3 檢測 HBV+HCC 的結節硬化症病人的 second hit

個案 (TSC419) 周邊血液於 2016 年的基因檢測結果 (圖二十七)，和其女兒帶有同樣的 *TSC2* 基因突變第 18 外顯子 (LOVD) c.2086 T>C, p.Cys696Arg 之錯義突變 (異型合子)，進而影響的 *TSC2* 蛋白功能。

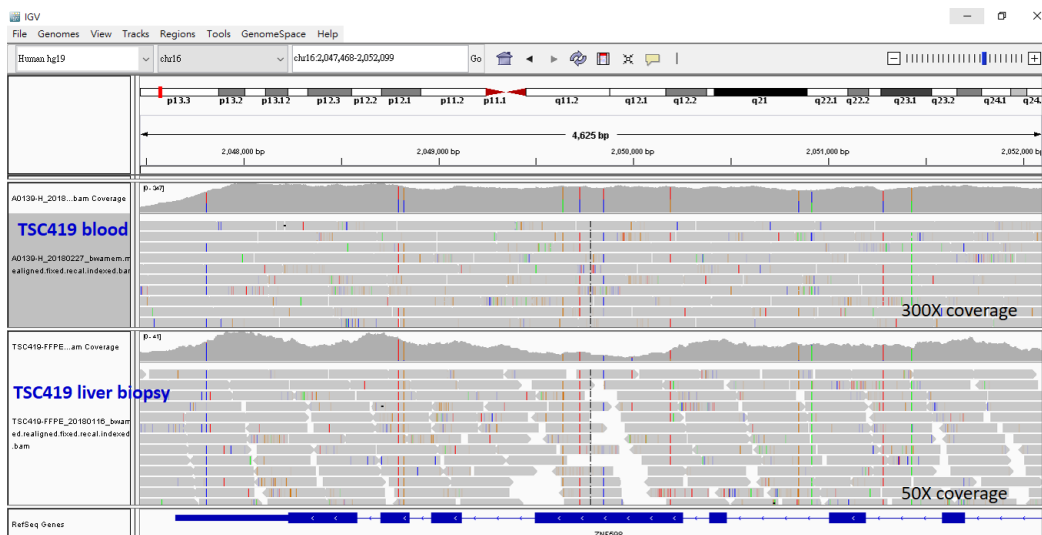


圖二十七、TSC419 桑格定序結果-*TSC2* exon18 (LOVD) c.2086 T>C

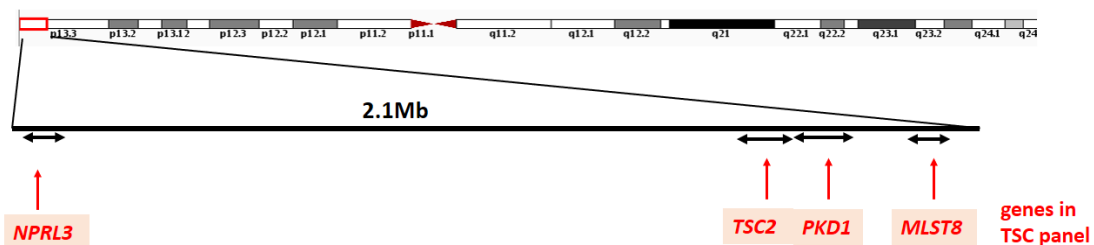
個案 (TSC419) 於 2017 年取肝臟腫切片進行基因檢測，發現 *TSC2* 基因在原本發生 germline mutation 的位置：第 18 外顯子 (LOVD) c.2086 T>C 異型合子 (heterozygous) 變為全部為 c.2086 T>C 突變型，而且次世代定序讀值深度 (read depth) 約 20，只有總平均讀值深度約 50 的一半，顯示此區域發生 (loss of heterozygosity, LOH) 的現象 (圖二十八)，也就是此位置從原本 50%T/50%C，變成只剩 50%C，而原本 50%T 所在的那一股片段發生缺失。而此 LOH 區域在進行本 TSC panel 的範圍下，涵蓋第 16 號染色體上的 *NPRL3*、*PKD1*、*MLST8* 等基因共至少約 2.1Mb 以上 (圖二十九、圖三十)。



圖二十八、TSC419 次世代定序結果-TSC2 exon18 c.2086T>C, p.Cys696Arg



圖二十九、TSC419 第 16 號染色體發生 LOH- 涵蓋第 16 號染色體上的 *NPRL3*、*TSC2*、*PKD1*、*MLST8* 等基因共至少約 2.1Mb 以上



圖三十、TSC419 第 16 號染色體發生 LOH- 涵蓋第 16 號染色體上的 *NPRL3*、*TSC2*、*PKD1*、*MLST8* 等基因共至少約 2.1Mb 以上

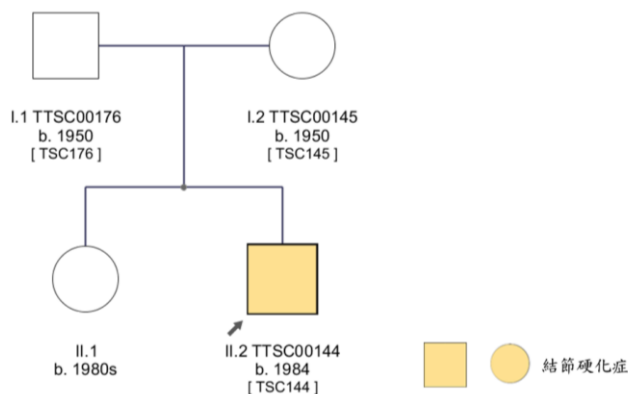


3.2.4 利用 minigene 來確認基因剪接 (splicing) 狀況

案例一、TSC144 (TF042)

1.臨床表徵

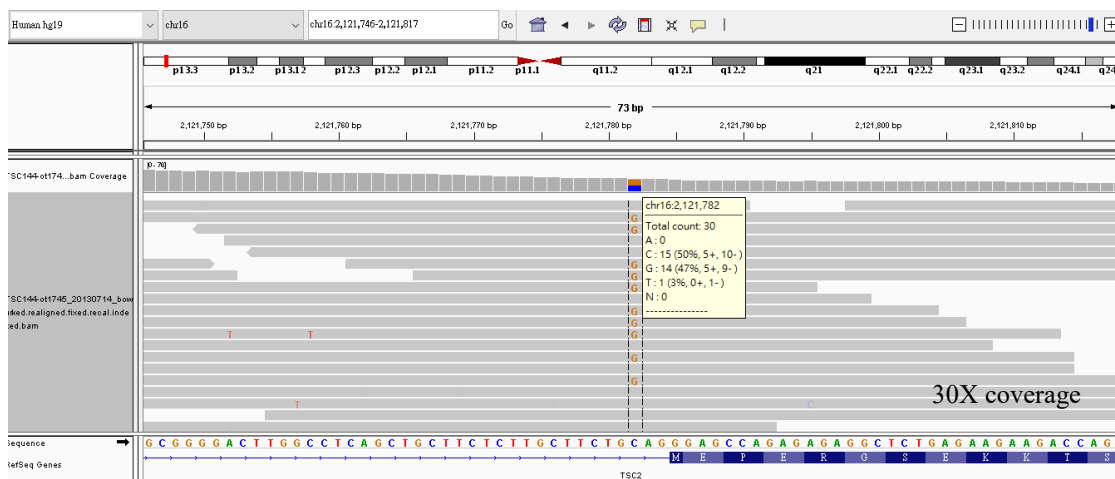
受試者 (TSC144) 為其家族 TF042 第一個被發現有結節硬化症的人。其父親 (TSC176) 和母親 (TSC145) 同時也加入研究。



圖三十一、TSC144 (TF042) 家族譜圖

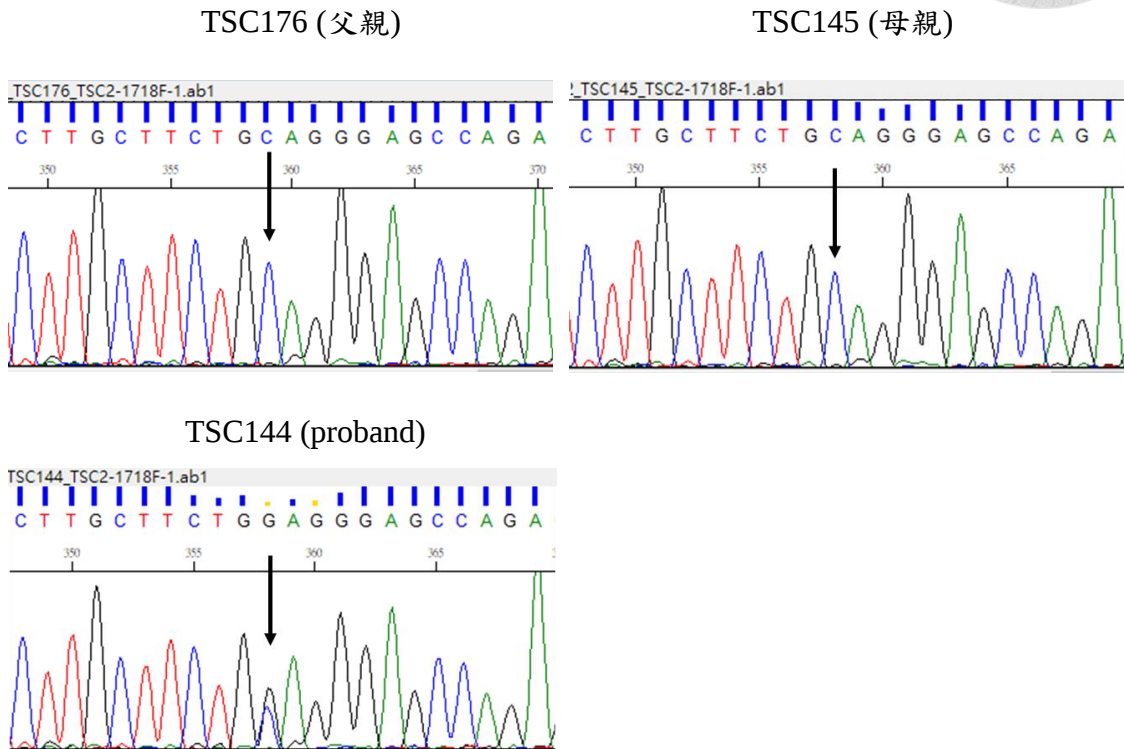
2.基因檢測

在受試者 (TSC144) 找到一個懷疑會影響 splicing 的變異點：TSC2 (NM_000548) exon19: c.1947-3C>G (heterozygous)，過去此位點也沒有被文獻報導過的紀錄，故無法斷定其影響 splicing 的實際狀況。



圖三十二、TSC144 次世代定序結果- TSC2 (NM_000548) exon19: c.1947-3C>G

以桑格定序確認受試者 (TSC144) 次世代定序發現的變異點，並同時對其父親 (TSC176) 及母親 (TSC145) 針對相同點位進行桑格定序，確認其無結節硬化症表徵的父母不帶有此位點。為受試者 (TSC144) 身上新發生的變異 (de novo)。

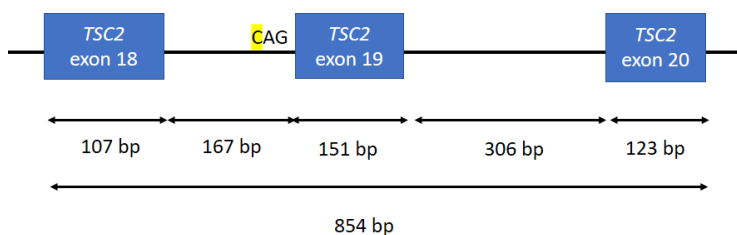


圖三十三、TF042 家族桑格定序結果-TSC144、TSC145、TSC176

3.Human Splicing Finder (HSF) 軟體預測及 ACMG 判讀

軟體預測 *TSC2* (NM_000548) exon19: c.1947-3C>G，改變了原本的 acceptor site，可能會影響 splicing[20]。且此變異點為 de novo。根據 ACMG 準則屬於高度懷疑致病的程度[38]。

4.minigene insert DNA 設計



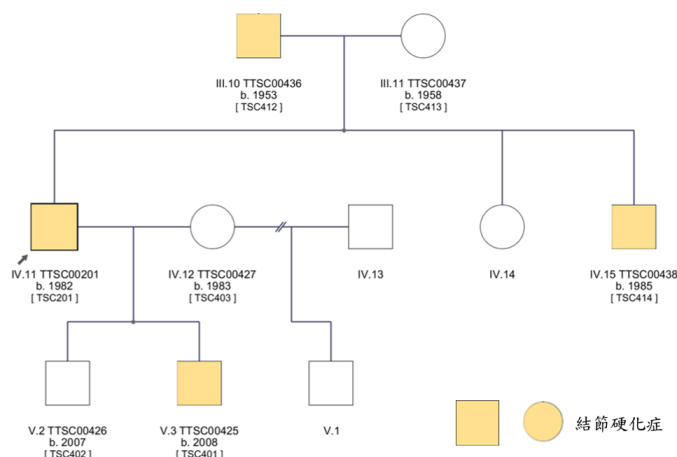
圖三十四、TSC144 minigene insert DNA 設計



案例二、TSC201 (TF064)

1.臨床表徵

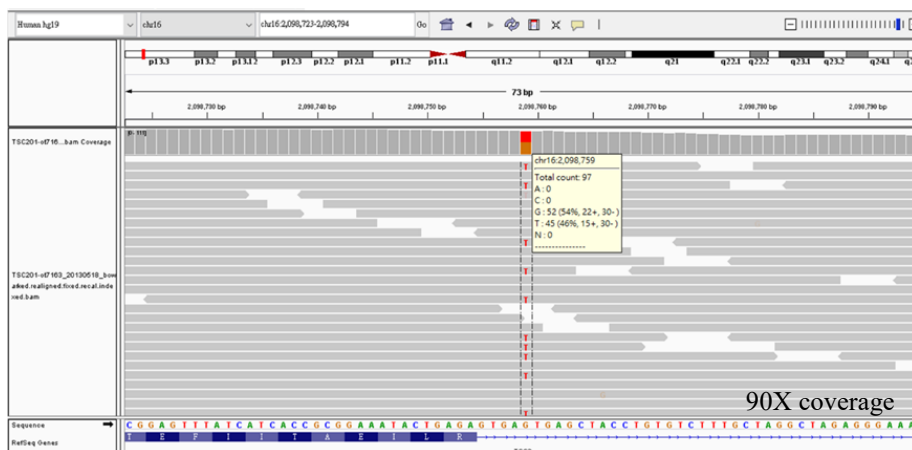
受試者 (TSC201) 為其家族 (TF064) 第一個被發現有結節硬化症的人。其父母親、配偶、弟弟、兩個兒子同時也加入研究。其父親、弟弟、一個兒子，在臨床也有結節硬化症相關的臉部皮膚表徵，但先前都沒有特別確診或追蹤。



圖三十五、TSC201 (TF064) 家族譜圖

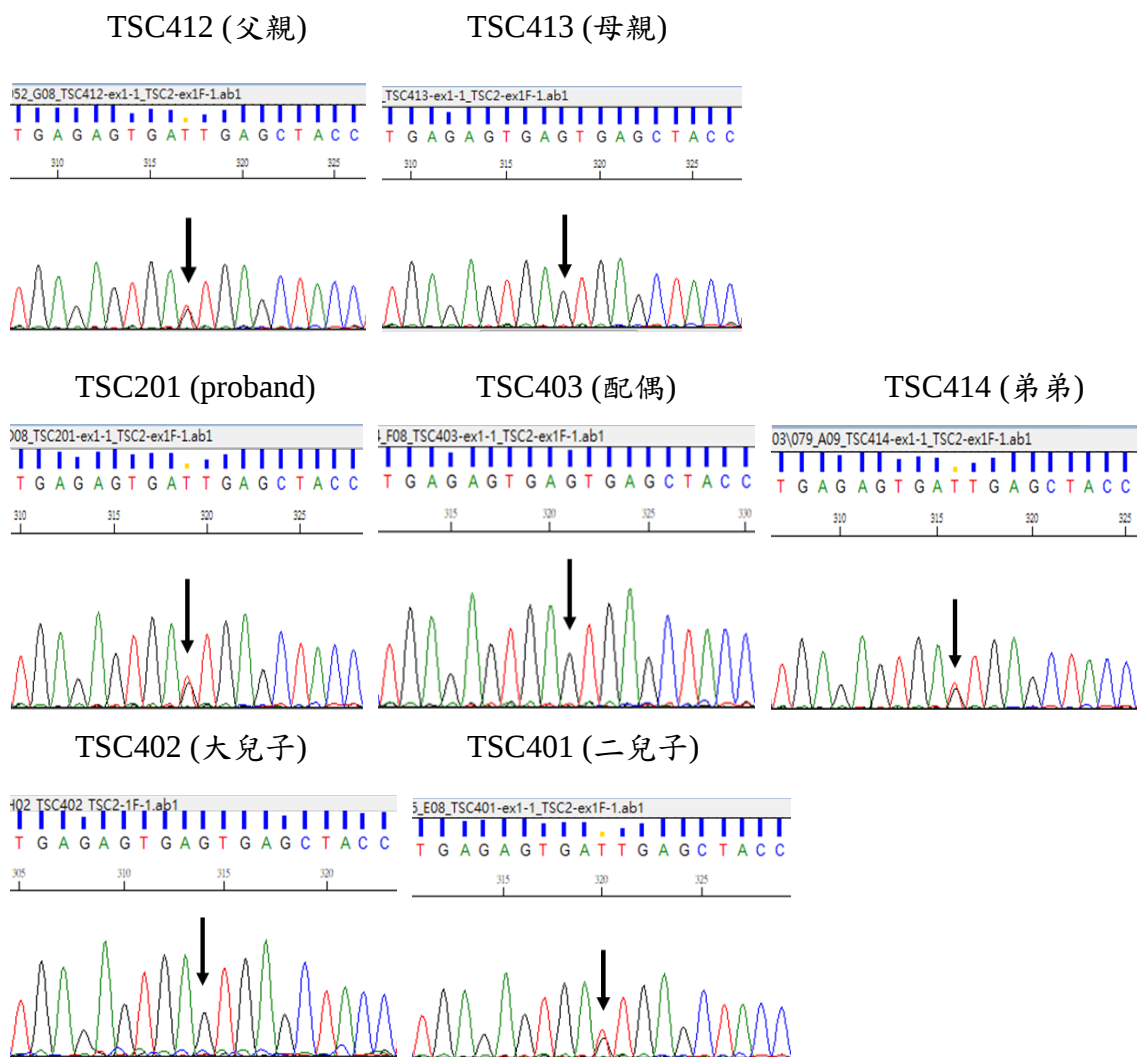
2.基因檢測

在受試者 (TSC201) 找到一個懷疑會影響 splicing 的變異點：*TSC2* (NM_000548) exon2: c.138+5G>T (heterozygous)。在 *TSC2* LOVD 資料庫沒有查到曾發現 c.138+5G>T 的紀錄，但可查到過去曾有被文獻報導過 4 次 c.138+5G>A，認為具致病性[45, 46]。



圖三十六、TSC201 次世代定序結果- *TSC2* (NM_000548) exon2: c.138+5G>T

以桑格定序確認受試者 (TSC201) 次世代定序懷疑的變異點，並對其父親 (TSC412)、母親 (TSC413)、配偶 (TSC403)、弟弟 (TSC414)、大兒子 (TSC402)、二兒子 (TSC401) 針對相同點位進行桑格定序，確認其有結節硬化症特徵的父親 (TSC412)、弟弟 (TSC414)、第二個兒子 (TSC401) 帶有同樣位點，在其他人身上則不帶有此點位。符合 co-segregation 的原則，帶此變異點位者為 TSC 病人。為受試者 (TSC201) 從父系家族遺傳而來，並傳給了下一代的第二個兒子 (TSC401)。

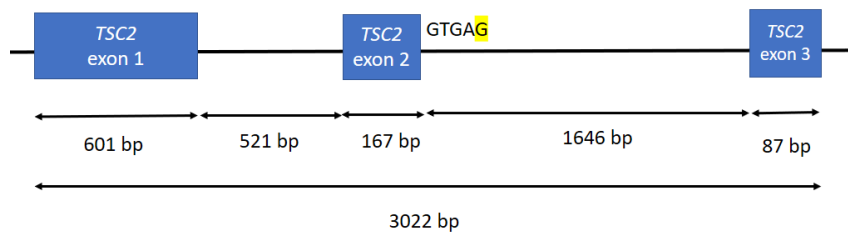


圖三十七、TF064 家族桑格定序結果-TSC2 (NM_000548) exon2: c.138+5G>T

3.Human Splicing Finder (HSF) 軟體預測及 ACMG 判讀

軟體預測 *TSC2* (NM_000548) exon2: c.138+5G>T 會改變原來的 donor site，會創造一個 exonic ESS (an exonic splicing silencer site)，可能會影響 splicing[20]。且此變異點符合共分離 (cosegregation) 的原則。根據 ACMG 準則屬於高度懷疑致病的程度[38]。

4.minigene insert DNA 設計



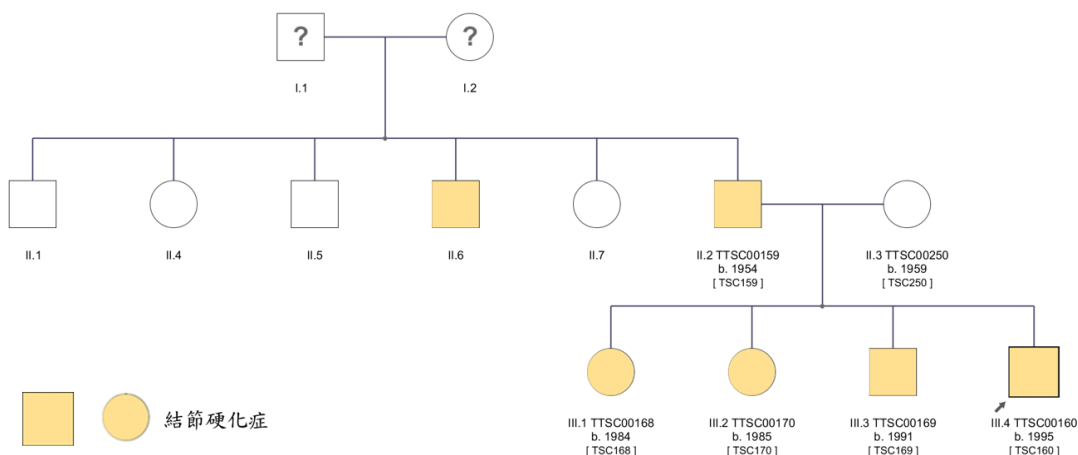
圖三十八、TSC201 minigene insert DNA 設計



案例三、TSC160 (TF051)

1.臨床表徵

受試者 (TSC160) 為其家族 TF051 第一個被發現有結節硬化症的人。其父母親和另外三位手足也同時也加入研究。其父親、兩個姊姊、一個哥哥，在臨床上也有結節硬化症相關的表徵。

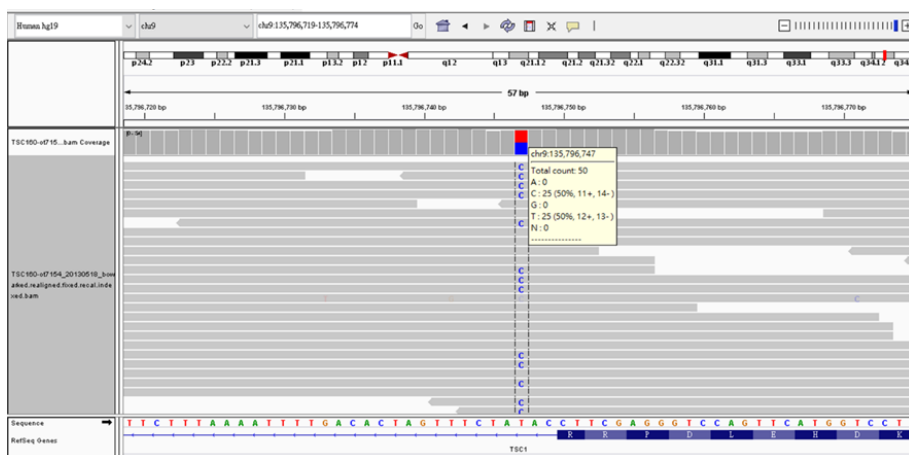


圖三十九、TSC160 (TF051)家族譜圖

“？”表示沒經過臨床醫師評估，且受試者表示不清楚家人狀況

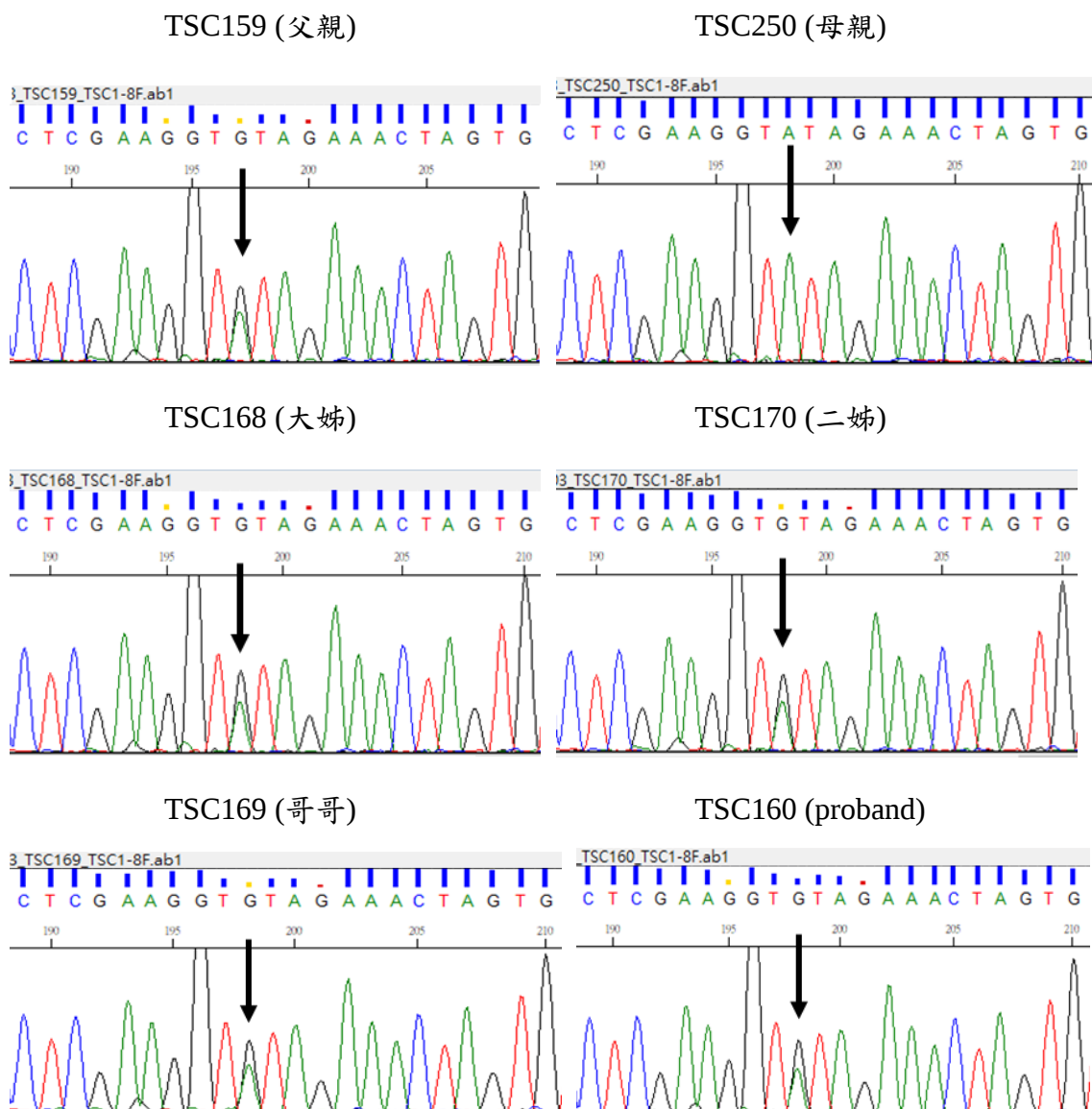
2.基因檢測

在受試者 (TSC160) 找到一個懷疑會影響 splicing 的變異點：*TSC1* NM_000368 exon8: c.737+3A>G (heterozygous)。在 *TSC1* LOVD 資料庫曾被報導 2 次，但不確定其致病性[47, 48]。



圖四十、TSC160 次世代定序結果- *TSC1* NM_000368 exon8:c.737+3A>G

以桑格定序確認受試者 (TSC160) 次世代定序發現懷疑的變異點，並對其父親 (TSC159)、母親 (TSC250)、大姊 (TSC168)、二姊 (TSC170)、哥哥 (TSC169) 針對相同點位進行桑格定序，確認其有結節硬化症表徵的父親 (TSC159)、大姊 (TSC168)、二姊 (TSC170)、哥哥 (TSC169) 帶有同樣位點，在母親 (TSC250) 身上則不帶有此點位。符合 co-segregation 的原則，帶此變異點位者為 TSC 病人。為受試者 (TSC160) 從父系遺傳而來。

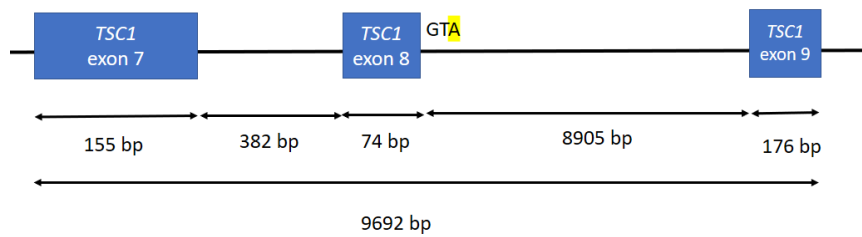


圖四十一、TF051 家族桑格定序結果- TSC159、TSC250、TSC168、TSC170、TSC160

3.Human Splicing Finder (HSF) 軟體預測及 ACMG 判讀

軟體預測此位點 *TSC1* (NM_000368) exon 8: c.737+3A>G 會改變原本的 donor site，創造一個 exonic ESS site，可能會影響 splicing[20]。在家族中各患有結節硬化症的家屬中，此變異點符合共分離 (co-segregation) 的原則，根據 ACMG 準則屬於高度懷疑致病的程度[38]。

4.minigene insert DNA 設計



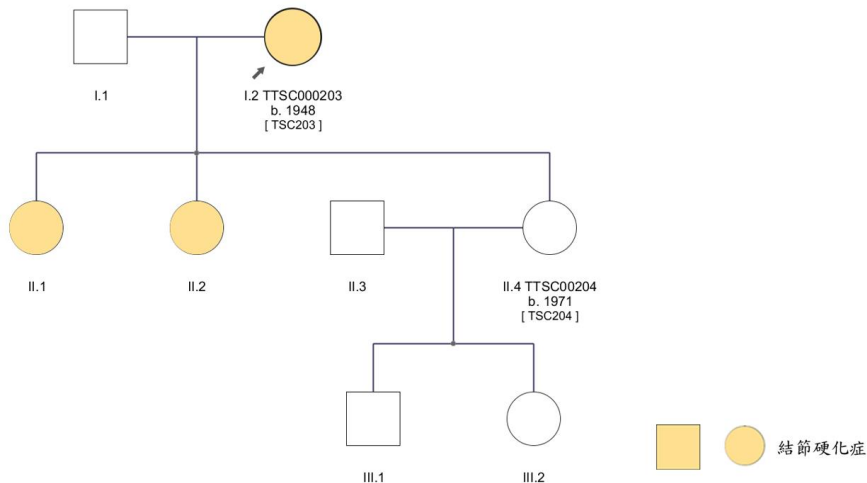
圖四十二、TSC160 minigene insert DNA 設計



案例四、TSC203 (TF065)

1.臨床表徵

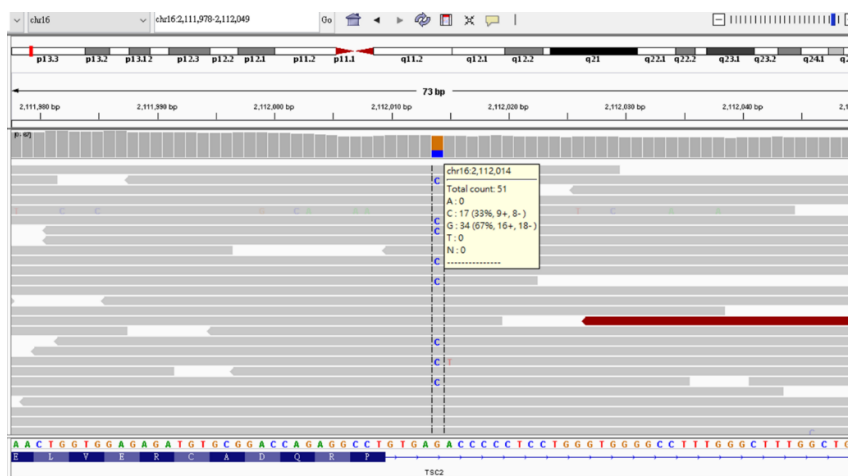
受試者 (TSC203) 為其家族 (TF065) 第一個被發現有結節硬化症的人。其小女兒 (TSC204) 同時也加入研究。其另兩個女兒，在臨床上也有結節硬化症相關的表徵，但先前都沒有特別確診或追蹤，也沒有加入本研究。



圖四十三、TSC203 (TF065) 家族譜圖

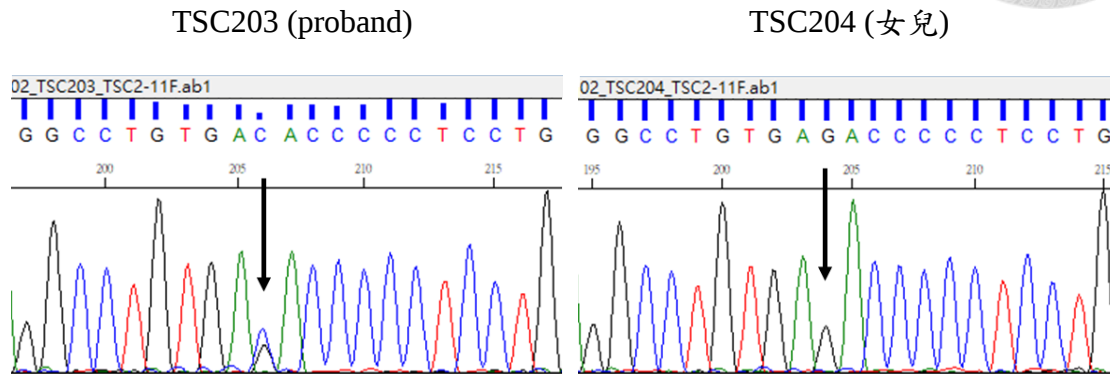
2.基因檢測

在受試者 (TSC203) 找到一個懷疑會影響 splicing 的變異點：*TSC2* (NM_000548) exon12: c.1257+5G>C (heterozygous)，無法斷定其影響 splicing 的實際狀況。在 *TSC2* LOVD 資料庫沒有被報導過[46]。



圖四十四、TSC203 次世代定序結果- *TSC2* (NM_000548) exon12: c.1257+5G>C

以桑格定序確認 TSC 受試者 (TSC203) 次世代定序發現懷疑的變異點，並對其非 TSC 女兒 (TSC204) 針對相同點位進行桑格定序，確認在女兒 (TSC204) 身上則不帶有此點位。

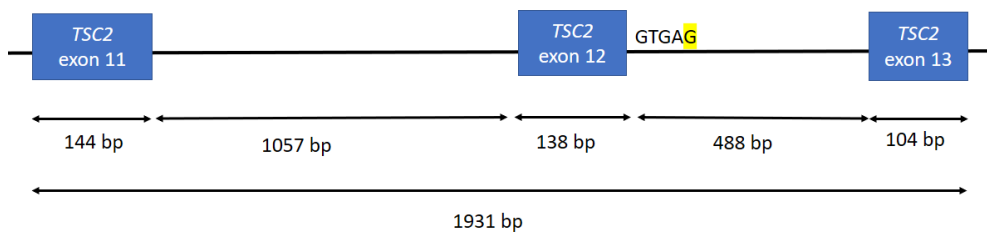


圖四十五、TF065 家族桑格定序結果- TSC203、TSC204

3.Human Splicing Finder (HSF) 軟體預測及 ACMG 判讀

軟體預測此位點 *TSC2* (NM_000548) exon12: c.1257+5G>C 會改變原本的 donor site，創造一個 intronic ESE site，可能不會影響 splicing[20]。根據 ACMG 準則尚未能達到確定或高度懷疑致病的程度[38]。

4.minigene insert DNA 設計



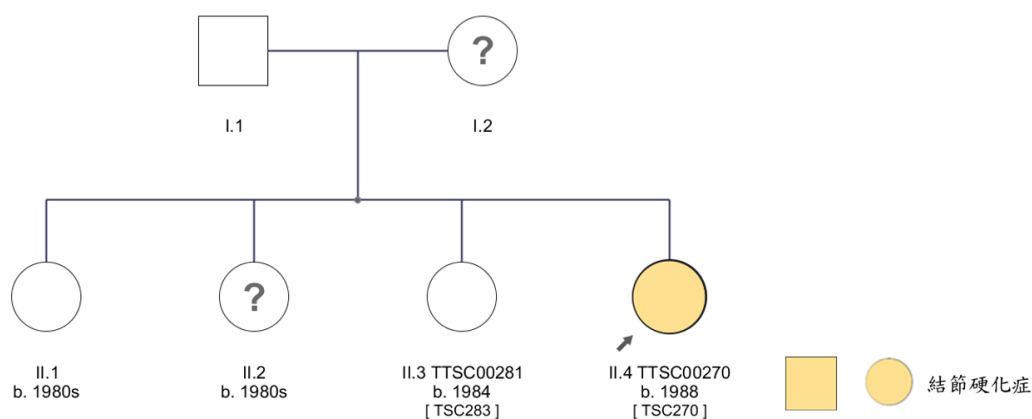
圖四十六、TSC203 minigene insert DNA 設計



案例五、TSC270 (TF085)

1.臨床表徵

受試者 (TSC270) 為其家族 (TF085) 第一個被發現有結節硬化症的人。其三姊 (TSC283) 同時也加入研究，在臨床上沒有結節硬化症相關的表徵。

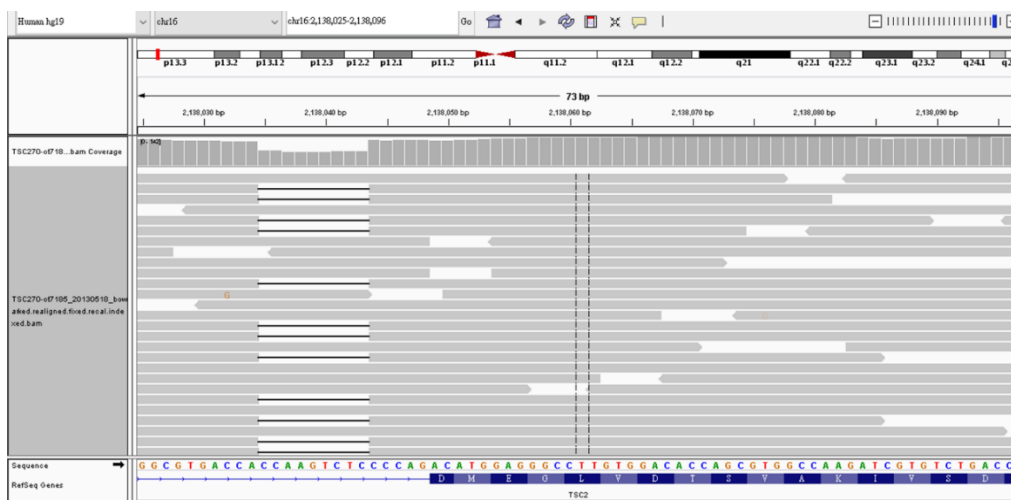


圖四十七、TSC270 (TF085) 家族譜圖

“？”表示沒經過臨床醫師評估，且受試者表示不清楚家人狀況

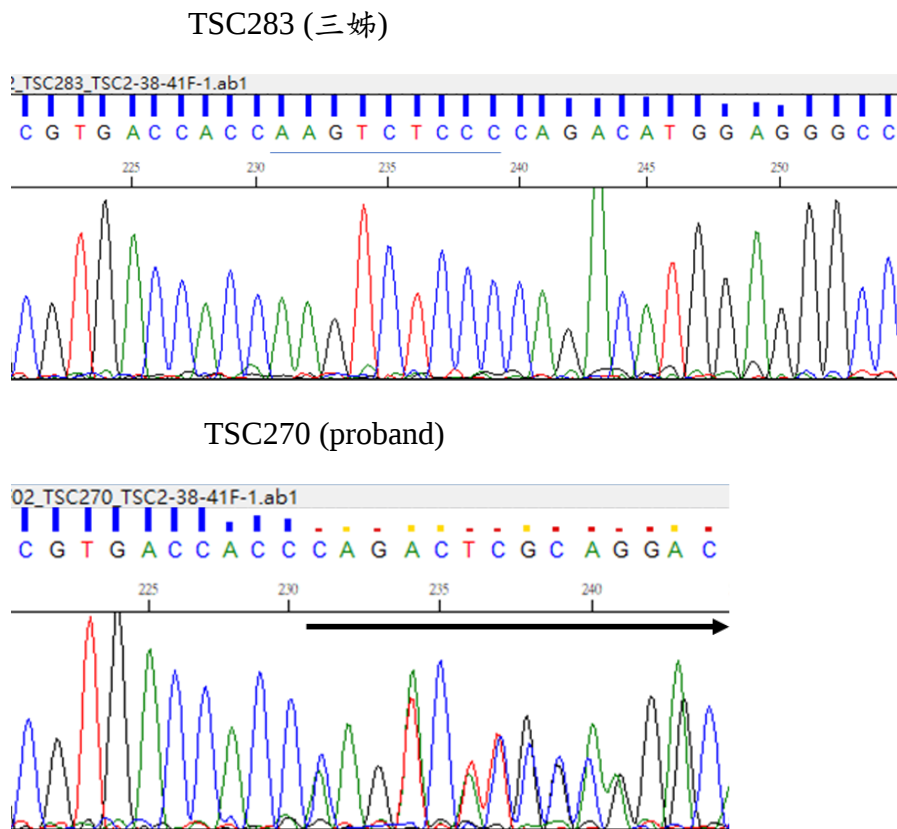
2.基因檢測

在 NGS 檢測中，受試者 (TSC270) 找到一個懷疑會影響 splicing 的變異：
TSC2 (NM_000548) exon40 上游有 9 bp 被刪除 (heterozygous)，無法斷定其影響 splicing 的實際狀況。在 TSC2 LOVD 資料庫沒有被報導過[46]。



圖四十八、TSC270 次世代定序結果

以桑格定序確認 TSC 受試者 (TSC270) 次世代定序懷疑的點位，確認實際變異點位為 *TSC2* (NM_000548) exon 40: c.5069-12_-4del (heterozygous)。並對其非 TSC 之三姊 (TSC283) 針對相同點位進行桑格定序，確認其三姊身上則不帶有此變異。

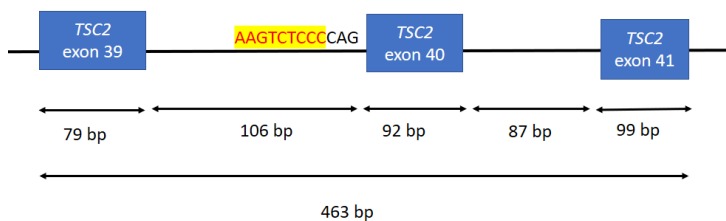


圖四十九、TF085 家族桑格定序結果- TSC270、TSC283

3.Human Splicing Finder(HSF)軟體預測及 ACMG 判讀

軟體預測此位點並不會改變原本的 splicing motif，可能不會對 splicing 造成影響[20]。根據 ACMG 準則尚未能達到確定或高度懷疑致病的程度[38]。

4.minigene insert DNA 設計



圖五十、TSC270 minigene insert DNA 設計



3.3 遺傳諮詢

3.3.1 案例一 (TSC201)

個案 (TSC201) 為 56 歲男性，出生時臉部即有一塊大塊的血管纖維瘤一直到現在沒有變，個案的爸爸和弟弟臉上也有相同的表現，個案家族及其本身原先並沒有意識到自己患有結節硬化症，也沒有做追蹤。結婚有了第一個兒子到目前為止 10 歲，沒有結節硬化症相關臨床表現，直到第二個兒子出生，在新竹的醫院發現心臟有結節，才進而被確診為結節硬化症。此二兒子在台大做基因檢測，在 *TSC2* 基因上第一個外顯子 (LOVD) 後發現懷疑會影響 splicing site 的突變。欲請父母抽血確認此位點為遺傳自父母或為新發生的變異時，個案臉上的表徵被懷疑也同樣為結節硬化症。其爸爸和弟弟之後陸續加入研究，發現臉上也具有和個案同樣的臉部血管纖維瘤表徵，針對同一位點進行基因檢測，也發現帶有此變異點。之後做檢查，發現個案腦部有 cortical tubers/subcortical tubers、SEGA，左側腎臟也有囊腫。皮膚有血管纖維瘤、白斑、鯊魚皮斑、額頭有一大斑塊。

個案至今病識感仍不強，不認為自己患有結節硬化症，認為只有第二個兒子患病。目前比較擔心的是尚未發病的第一個兒子未來會不會發病，做了基因檢測後其並不帶有此變異點，應可較寬心。個案為 HBV 帶原者，故未來也應留意肝臟腫瘤做定期追蹤。同時也提醒其他帶有此點位的家人，定期追蹤各器官狀況（家族譜圖如圖五十一）。

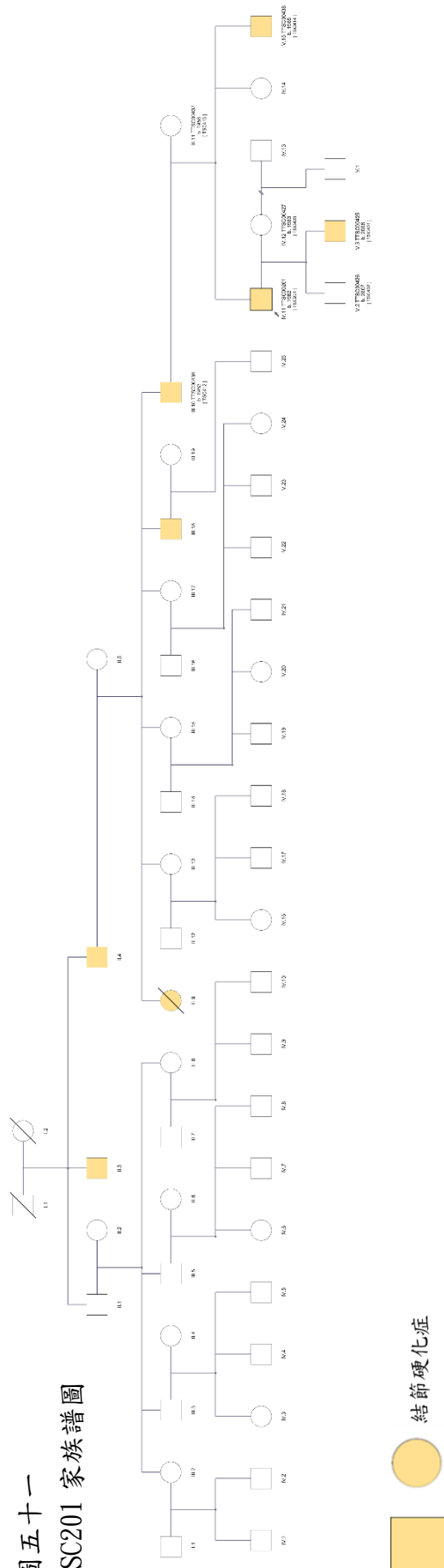
3.3.2 案例二 (TSC419)



55 歲男性，學歷讀到高工，之前在加油站工作。30 歲時，有一女兒於台北榮總出生，發現心臟有腫瘤，心臟腫瘤隨著年紀長大而變小、消失，1~2 個月大時開始有癲癇，智力發展障礙，目前可以自理生活但不會說話，之前就讀啟智學校，現在在教養院。臉部有血管纖維瘤、脫色斑，指甲有指甲週纖維瘤、鯊魚皮斑、淋巴肌瘤。2015 年於台大醫院做基因檢測，發現確定致病點為 *TSC2* 基因突變 c.2086 T>C, p.Cys696Arg。接著於 2016 年，個案也針對女兒被找到的結節硬化症致病變異點做檢測，也確定帶有和女兒相同的致病點位。個案本身身上一直有臉部血管纖維瘤、指甲周纖維瘤、多發性肺泡增生、AML、慢性 B 型肝炎，但在女兒被確診為結節硬化症之前，個案都沒有被確診，也沒有做特別追蹤，只有有症狀時才會就醫。2017.11.14 因為突然爆瘦而到台大醫院急診，發現肝臟腫瘤 (hepatocellular carcinoma) 突然變大，而於 2017.12 住院，同時使用免疫治療和 Afinitor，狀況一度好轉，肝臟腫瘤大小獲得控制，但後來肝功能衰竭得很快，且產生很多腹水。奮鬥了 5 個月後，於 2018.04 底過世。

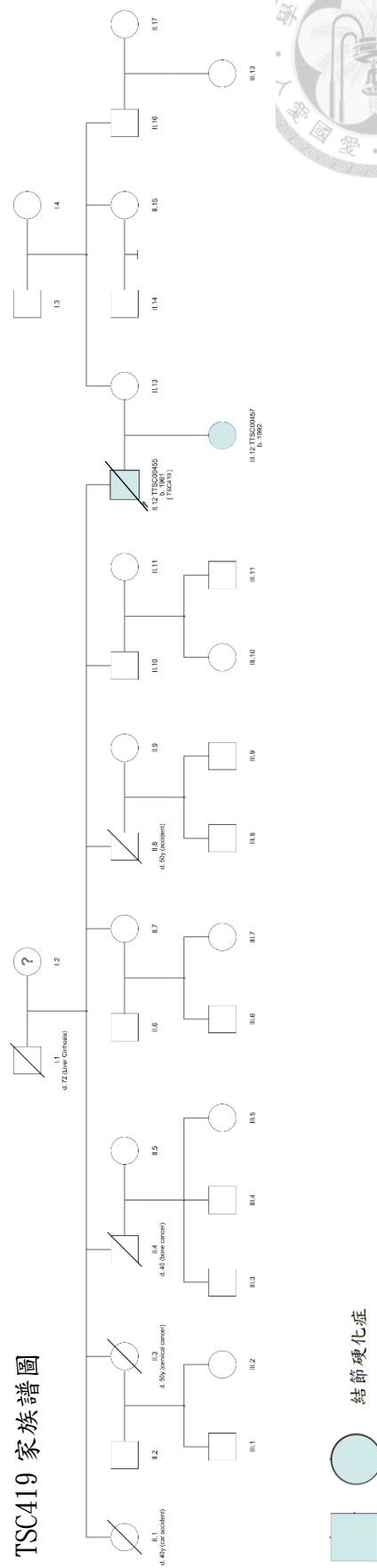
個案同為結節硬化症的女兒肝臟也曾被超音波檢查出有結節，個案妻子預計也要帶女兒去檢驗是否為 B 肝帶原，並積極監控肝臟 AML 的發展狀況，避免發展到如個案如此嚴重棘手的地步（家族譜圖如圖五十二）。

圖五十一
TSC201 家族譜圖



結節硬化症

圖五十二
TSC419 家族譜圖



結節硬化症

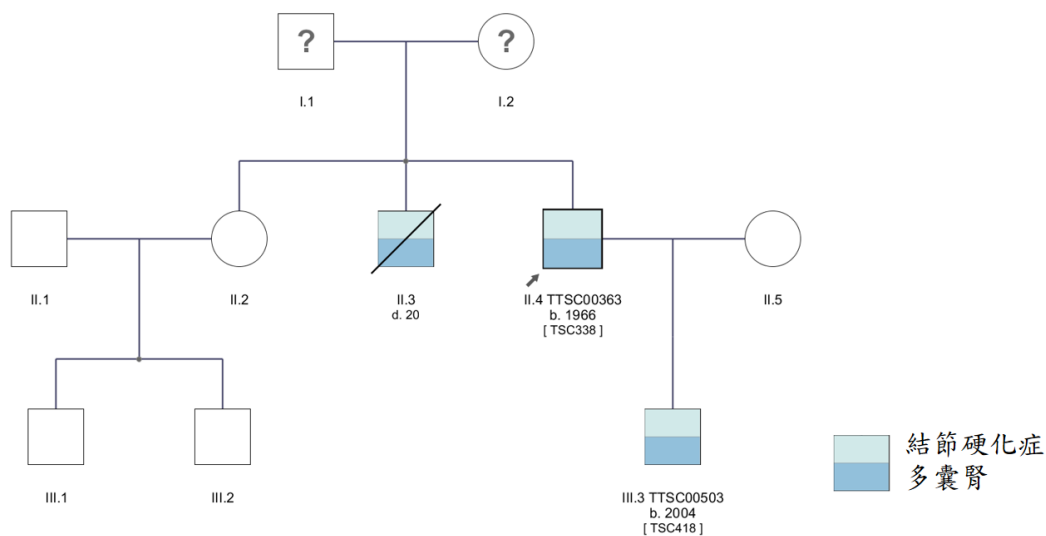


3.3.3 案例三 (TSC418)



個案 (TSC418) 是一個 13 歲的男生，其父親 (TSC338) 於 2014 年時有加入研究案，臨床表現有：臉部血管纖維瘤、腎血管肌脂肪瘤、斑駁樣皮膚斑、多個腎囊腫、多發性肺泡細胞增生。父親 (TSC338) 做過基因檢測，因本身也有多囊腎的表現，故同時做了 *TSC1*、*TSC2*、*PKD1*、*PKD2*，在 *TSC2* 上發現了大片段的刪除，第 16 對染色體從第 1922745 個核苷酸至 2138606 個核苷酸發生大片段缺失(兩染色體中僅一條發現變異)，總共缺失 215862 個核苷酸，造成 *TSC2* 基因遺失，影響基因功能；而在 *PKD1* 上發現第 15 個表現子上帶有一個影響基因功能的 stop codon 變異點 c.3561C>A; p.Y1187X (NM_000296)。個案的伯父，也因為腎臟相關疾病於 20 幾歲時即過世。但個案父親對於其哥哥及父母親是否有結節硬化症或多囊腎，表示並不瞭解。個案於 2017 年，因也有結節硬化症相關表現，故來看診時也來做基因檢測做確認，看是否和父親帶有同樣基因變異。因 *TSC2* 和 *PKD1* 皆是位於第 16 號染色體上，而當初因次世代定序的方法限制，未能確認個案父親的 *TSC2* 和 *PKD1* 的兩個致病變異是位於同一條 16 號染色體上，還是分別位於不同條 16 號染色體上，這會決定個案的下一代是否會同時遺傳到結節硬化症和多囊腎兩種疾病。

而藉由個案的基因檢測，我們可以釐清這 *TSC2* 和 *PKD1* 的兩個致病變異的相位關係，是位於同一條染色體上，故可推測其伯父應也是同時患有結節硬化症和多囊腎。個案須同時追蹤結節硬化症和多囊腎的疾病發展。未來若到達結婚生育年齡時，可以利用此已知帶有的 *TSC2* 或 *PKD1* 變異點位做篩選，可同時避免再繼續將這兩種疾病遺傳下去（家族譜圖如圖五十三）。



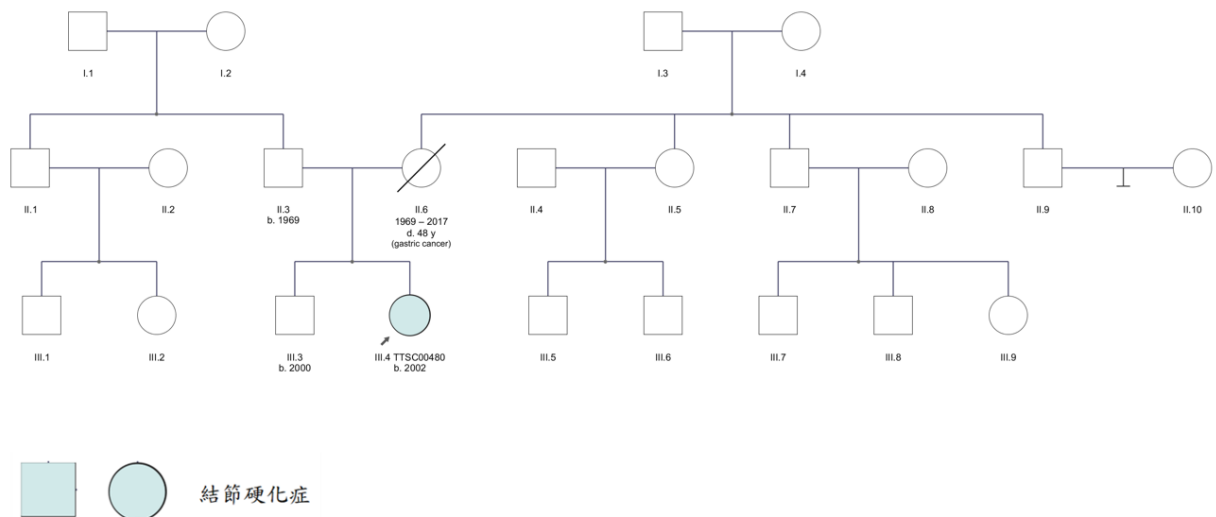
圖五十三、TSC418 家族譜圖

3-3-4 案例四 (TTSC00480)

16 歲女生，由父親陪同看診。個案從幼稚園的時候就有癲癇的症狀，在馬偕醫院確診，已有重大傷病卡。曾兩次因癲癇發作而住院，服用抗癲癇藥物 2~3 年後，已停藥且未再發作。國小開始臉部有長血管纖維瘤，且有持續變多的趨勢。之後沒有再特別看醫生追蹤，曾考慮雷射去除臉部病灶，但又怕後續再持續長出。直到 2017.07 得知有結節硬化症皮膚藥膏才來台大看診，有安排各相關檢測，確認有腎臟 AML 和多發性肺泡增生。

從 2017.09 拿到藥開始擦，父親口述一天擦兩次，至今擦了一個月，但藥膏仍剩半條以上，以個案臉部血管纖維瘤遍布的面積來看，似乎沒有按時持續擦藥。個案認為皮膚藥膏有效，但擦起來沒有特別涼涼的感覺，所以不會特別想擦，有時候會忘記。目前個案就讀高一表演藝術科。個案父親表示個案在國中時有幾個同學看到她臉部的病灶會覺得害怕，會被同學排擠，但現在高中同學比較能接納她的外觀。個案話不多，一開始對諮詢有些不耐煩，但後來會在父親說明她的情況時適時給予補充，似乎對擦藥有一點不明原因地排斥。個案母親今年因胃癌而過世，個案不會逃避談此事，但很在意，可能因此影響到她的情緒。

今天個案基因檢測的報告結果出來：在*TSC2*基因上發現確定致病的變異點：c.5227_5244delCGGCTCCGCCACATCAAG, p.Arg1743_Lys1748del，父親對於醫生解釋個案未來仍可以考慮生育感到希望，個案的智力和生活自理正常，可以經由试管婴儿和產前基因診斷避免結節硬化症遺傳到下一代，原本他們不敢有生育的打算。個案父親表示想讓自己和兒子也做基因檢測，在家庭經濟還能負擔的情況下，希望能提供一些家族資料為研究罕見疾病盡一份心力（家族譜圖如圖五十四）。



圖五十四、TTSC00480 家族譜圖



第四章 討論

4.1 臺灣的結節硬化症流行病學資料

在本研究收納的臺灣結節硬化症病人中，次世代定序基因檢測確診檢出率約 88%，3%為 VUS，9%沒有發現任何懷疑的變異點。其中有 20%為 *TSC1* 基因變異，80%為 *TSC2* 基因變異；30%為遺傳而來，70%為新發生的變異。統計出來臺灣的結節硬化症的流行病學狀況，跟過去文獻提出的比例沒有明顯差異[3, 12, 49, 50]。

4.2 基因檢測檢出率

在本研究，臨床是結節硬化症確診，但次世代定序結果找不到懷疑致病位點的家族，一開始共 16 個，其中有 19% (3/16) 最後仰賴皮膚病灶檢體提高致病變異點的比例，回頭和周邊血液基因檢測結果做比對後，確認了為低比例的 *TSC1* 或 *TSC2* 鑲嵌型。而並非每個次世代定序結果找不到懷疑致病位點的病人，都剛好有取皮膚病灶檢體可做比對，故這些人當中實際為低比例 *TSC1* 或 *TSC2* 鑲嵌型的病人或許比例更高。未來可針對找不到懷疑致病位點的病人，取其病灶檢體，提升基因檢測檢出率[12]。

本研究目前沒有在皮膚病灶檢體 DNA 中找到 second hit，可能原因是手術取皮膚病灶時，取下的區域太小，沒有分離正常細胞和病灶細胞，而含 second hit 的細胞比例又低於 10%所致。過去文獻指出 second hit 存在於真皮層中的類纖維母細胞 (fibroblast-like cells) 中，而這些細胞因 mTOR 路徑失去控制，大量製造 epiregulin 蛋白，使表皮層的角質細胞 (keratinocyte) 大量增生，但大量增生的角質細胞 (keratinocyte) 本身並不帶有 second hit，而只帶有 first hit[43]。故取下的病灶區域，可能大部分的比例是不帶有 second hit 的細胞，而偵測不到 second hit 存在。



4.3 HBV+HCC

B 型肝炎帶原者可能發展為慢性肝炎、肝硬化，甚至最終發展至肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)，而 mTOR 路徑過度活化，是促使細胞癌化的重要角色。有 12% 的有 HCC 的患者腫瘤組織中可找到 *TSC2* 基因的缺失，7% 有 *HIF1A*、5% *ABPC3*、5% *RB1CC1*、5% *RPS6KA3*，有 5.3% 的 HCC 患者腫瘤組織中可找到 *TSC1* 基因的缺失，而帶有 *TSC1* 或 *TSC2* 基因變異的 HCC 病程發展較快且腫瘤較大。而約 20% HBV(+) HCC 亞洲患者可以找到 *TSC2* 基因的缺失。而有 *TSC1* 或 *TSC2* 基因的缺失的 HCC 以 everolimus 治療是有效的[51-54]。而在本研究的個案 (TSC419) 同時給予化學治療和 everolimus 治療，也有控制 HCC 持續擴張的效果。如此檢測 HCC 的患者腫瘤組織中是否帶有 *TSC1* 或 *TSC2* 基因變異，可能可做為臨床治療預測用藥是否有效果的參考依據。

4.4 遺傳諮詢

近年來結節硬化症的醫療和基因檢測才逐漸發展成熟，故現階段處於中年以上、年齡較高的結節硬化症患者，因不知自身疾病狀況而常有忽略病程發展的情況，通常是生下結節硬化症的小孩後，做基因檢測確認才發現自己也患有結節硬化症，但此年齡的患者因已在未就醫的情況下生活多年，易輕視自身追蹤和檢查的重要性，導致被發現時病情已較為嚴重難以治療，故醫療人員、疾病協會、遺傳諮詢人員的關切和提醒顯得十分重要。並告知其下一代生育年齡時，可考慮做產前基因檢測或試管嬰兒，防止同樣的疾病延續至下一代。不再只能碰運氣，或者是對結婚生子不抱持希望。另外，年紀較大的一代，因無施打 B 肝疫苗，罹患 B 型肝炎的比例也較高，因結節硬化症病人本身全身細胞已經帶有一個 *TSC1* 或 *TSC2* 致病變異，肝臟細胞也是，故若發展成 HBV+HCC 時，必帶著 *TSC1* 或 *TSC2* 致病變異，病程發展會較快且腫瘤較大[51-54]，故要提高警覺，以免延誤治療，造成悲劇。

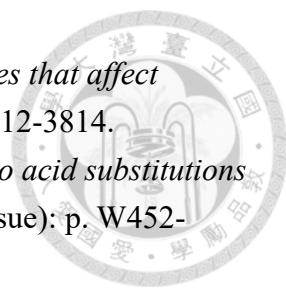
第五章 結論

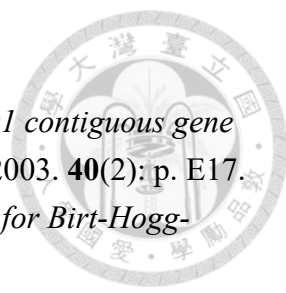
本研究整理了臺大醫院結節硬化症整合門診的病人 508 位，共 222 個家族，包含家族史、臨床表徵、基因檢測、各科追蹤檢查紀錄等資訊，在臺大安全網域下建構線上 TSC REDCap 資料庫。在本研究收納的臺灣結節硬化症病人中，次世代定序基因檢測確診檢出率約 88%，3%為 VUS，9%沒有發現任何懷疑的變異點。其中有 20%為 *TSC1* 基因變異，80%為 *TSC2* 基因變異；30%為遺傳而來，70%為新發生的變異。臺灣本土結節硬化症流行病學狀況與過去國外研究沒有明顯的差異[8]。

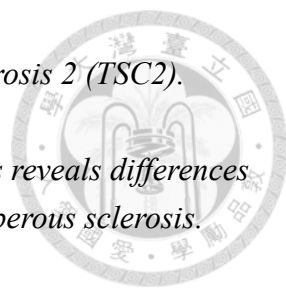
利用分析兩代直系親屬基因，可確認一同時患有結節硬化症和多囊腎的病人身上兩個致病變異點在染色體上的相位關係；從過去基因檢測未找到致病變異點位的病人之中，利用皮膚病灶檢體可以提高低比例鑲嵌型的患者，生殖細胞突變被檢測出來的比率；帶有 *TSC2* 生殖細胞突變且同時為 B 型肝炎帶原的結節硬化症病人若患有 HCC，則其 HCC 腫瘤會較大且侵略性更強。在其 HCC 腫瘤切片細胞發現除了患者原本的一個 *TSC2* 生殖細胞突變之外，另有一段約 2Mb 包含 *TSC2* 區域的缺失，使此區域由原本的異型合子變為 LOH 的狀況。使用免疫治療搭配 everolimus 治療對控制此病人的腫瘤擴張是有效果的，和過去文獻一致[52, 54]；最後，利用 minigene 來確認未確定致病性的剪接位變異點其轉錄出的 mRNA 是否有異，目前實驗仍在持續進行中。

第六章 參考文獻

1. O'Callaghan, F.J., et al., *Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis*. Lancet, 1998. **351**(9114): p. 1490.
2. Crino , P.B., K.L. Nathanson , and E.P. Henske *The Tuberous Sclerosis Complex*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(13): p. 1345-1356.
3. Kwiatkowski, D.J., *Tuberous Sclerosis Complex: Genes, Clinical Features and Therapeutics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2010: p. pp 29–60.
4. F, R., *Die Lymphfasse und ihre Beziehung zum Bindegewebe*. [German]. Berlin: A. Hirschwald; , 1862.
5. Bourneville, D.M., *Sclerose tubereuse des circonvolutions cerebrales: Idiotie et epilepsie hemiplegique*. Arch Neurol (Paris), 1880. **1**:81–91.
6. Consortium, E.C.T.S., *Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1305-15.
7. van Slegtenhorst, M., et al., *Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34*. Science, 1997. **277**(5327): p. 805-8.
8. Northrup, H., D.A. Krueger, and G. on behalf of the International Tuberous Sclerosis Complex Consensus, *Tuberous Sclerosis Complex Diagnostic Criteria Update: Recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference*. Pediatric neurology, 2013. **49**(4): p. 243-254.
9. Huang, J. and B.D. Manning, *The TSC1–TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth*. The Biochemical journal, 2008. **412**(2): p. 179-190.
10. Qin, W., et al., *Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex*. Hum Genet, 2010. **127**(5): p. 573-82.
11. Nellist, M., et al., *Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations*. BMC Med Genet, 2015. **16**: p. 10.
12. Tyburczy, M.E., et al., *Mosaic and Intronic Mutations in TSC1/TSC2 Explain the Majority of TSC Patients with No Mutation Identified by Conventional Testing*. PLoS Genet, 2015. **11**(11): p. e1005637.
13. Lam, H.C., J. Nijmeh, and E.P. Henske, *New developments in the genetics and pathogenesis of tumours in tuberous sclerosis complex*. J Pathol, 2017. **241**(2): p. 219-225.
14. Brogna, S. and J. Wen, *Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 107-13.
15. Hug, N., D. Longman, and J.F. Cáceres, *Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway*. Nucleic Acids Research, 2016. **44**(4): p. 1483-1495.

- 
16. Ng, P.C. and S. Henikoff, *SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(13): p. 3812-3814.
 17. Sim, N.-L., et al., *SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins*. Nucleic Acids Research, 2012. **40**(Web Server issue): p. W452-W457.
 18. Adzhubei, I., D.M. Jordan, and S.R. Sunyaev, *Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2*. Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.], 2013. **0 7**: p. Unit7.20-Unit7.20.
 19. Adzhubei, I.A., et al., *A method and server for predicting damaging missense mutations*. Nature methods, 2010. **7**(4): p. 248-249.
 20. Desmet, F.O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): p. e67.
 21. Coevoets, R., et al., *A reliable cell-based assay for testing unclassified TSC2 gene variants*. Eur J Hum Genet, 2009. **17**(3): p. 301-10.
 22. Rendtorff, N.D., et al., *Analysis of 65 tuberous sclerosis complex (TSC) patients by TSC2 DGGE, TSC1/TSC2 MLPA, and TSC1 long-range PCR sequencing, and report of 28 novel mutations*. Hum Mutat, 2005. **26**(4): p. 374-83.
 23. Hoogeveen-Westerveld, M., et al., *Functional assessment of variants in the TSC1 and TSC2 genes identified in individuals with Tuberous Sclerosis Complex*. Hum Mutat, 2011. **32**(4): p. 424-35.
 24. Hoogeveen-Westerveld, M., et al., *Functional assessment of TSC1 missense variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex*. Hum Mutat, 2012. **33**(3): p. 476-9.
 25. Hoogeveen-Westerveld, M., et al., *Functional assessment of TSC2 variants identified in individuals with tuberous sclerosis complex*. Hum Mutat, 2013. **34**(1): p. 167-75.
 26. Cooper, T.A., *Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements*. Methods, 2005. **37**(4): p. 331-40.
 27. Gaildrat, P., et al., *Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants*. Methods Mol Biol, 2010. **653**: p. 249-57.
 28. Fraser, F.C., *Genetic counseling*. Am J Hum Genet, 1974. **26**(5): p. 636-59.
 29. Resta, R., et al., *A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report*. J Genet Couns, 2006. **15**(2): p. 77-83.
 30. Senter, L., et al., *National Society of Genetic Counselors Code of Ethics: Explication of 2017 Revisions*. J Genet Couns, 2018. **27**(1): p. 9-15.
 31. Llamas Velasco, S., et al., *[TSC2/PKD1 contiguous gene deletion syndrome]*. An

- 
- Pediatr (Barc), 2013. **79**(1): p. 42-5.
32. Smulders, Y.M., et al., *Large deletion causing the TSC2-PKD1 contiguous gene syndrome without infantile polycystic disease*. J Med Genet, 2003. **40**(2): p. E17.
 33. Schmidt, L.S. and W.M. Linehan, *FLCN: The causative gene for Birt-Hogg-Dube syndrome*. Gene, 2018. **640**: p. 28-42.
 34. Asnaghi, L., et al., *mTOR: a protein kinase switching between life and death*. Pharmacol Res, 2004. **50**(6): p. 545-9.
 35. Kwiatkowski, D.J., *TSC1, TSC2, TSC3? Or mosaicism?* Eur J Hum Genet, 2005. **13**(6): p. 695-6.
 36. Bentley, D.R., et al., *Accurate Whole Human Genome Sequencing using Reversible Terminator Chemistry*. Nature, 2008. **456**(7218): p. 53-59.
 37. R., L.H.a.D., *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform*. Bioinformatics, Epub. [PMID: 20080505], 2010.
 38. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. **17**(5): p. 405-24.
 39. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
 40. Paul A. Harris, R.T., Robert Thielke, Jonathon Payne, Nathaniel Gonzalez, Jose G. Conde, Research electronic data capture (REDCap) – A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support, J, *REDCap (Research Electronic Data Capture)*. Biomed Inform. 2009 Apr;42(2):377-81., 2009.
 41. Girdea, M., et al., *PhenoTips: patient phenotyping software for clinical and research use*. Hum Mutat, 2013. **34**(8): p. 1057-65.
 42. Tyburczy, M.E., et al., *Sun exposure causes somatic second-hit mutations and angiofibroma development in tuberous sclerosis complex*. Human Molecular Genetics, 2014. **23**(8): p. 2023-2029.
 43. Li, S., et al., *Mesenchymal–epithelial interactions involving ephreclin in tuberous sclerosis complex hamartomas*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(9): p. 3539-3544.
 44. Wang, S.-J., *Topical Rapamycin and Calcitriol Therapy Trial and genetic testing for Cutaneous Lesions in Tuberous Sclerosis Complex (TSC) Patients*. 2017.
 45. Dabora, S.L., et al., *Mutational Analysis in a Cohort of 224 Tuberous Sclerosis Patients Indicates Increased Severity of TSC2, Compared with TSC1, Disease in Multiple Organs*. The American Journal of Human Genetics, 2001. **68**(1): p. 64-80.

- 
46. Sue Povey , R.E., *Tuberous sclerosis database-Tuberous sclerosis 2 (TSC2)*. Leiden University Medical Center, 2004-2014
47. Jones, A.C., et al., *Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(12): p. 2155-61.
48. Sue Povey , R.E., *Tuberous sclerosis database-Tuberous sclerosis 1 (TSC1)*. Leiden University Medical Center, 2004-2014
49. Hung, C.C., et al., *Molecular and clinical analyses of 84 patients with tuberous sclerosis complex*. BMC Med Genet, 2006. **7**: p. 72.
50. Napolioni, V. and P. Curatolo, *Genetics and Molecular Biology of Tuberous Sclerosis Complex*. Current Genomics, 2008. **9**(7): p. 475-487.
51. Ho, D.W.H., et al., *TSC1/2 mutations define a molecular subset of HCC with aggressive behaviour and treatment implication*. Gut, 2017. **66**(8): p. 1496-1506.
52. Huynh, H., et al., *Loss of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) Is Frequent in Hepatocellular Carcinoma and Predicts Response to mTORC1 Inhibitor Everolimus*. Molecular cancer therapeutics, 2015. **14**(5): p. 1224-1235.
53. Cho, J., et al., *Loss of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) as a Predictive Biomarker of Response to mTOR Inhibitor Treatment in Patients with Hepatocellular Carcinoma*. Translational Oncology, 2016. **9**(5): p. 466-471.
54. Habib, S.L., et al., *Is mTOR Inhibitor Good Enough for Treatment All Tumors in TSC Patients?* Journal of Cancer, 2016. **7**(12): p. 1621-1631.

附錄一、PCR primers

(1) *TSC1* PCR primers

Exon No.	name	forward	reverse	size (bp)	Tm
3	TSC1-3F	acacgtgcattagttgtct		483	50
	TSC1-3R	taagaatcatgcagtgaacc	ggttcactgcatgattctta		
4	TSC1-4F	gaactgtaatgctgcacaaa		418	50
	TSC1-4R	gtaggacccatgattcttga	tcaagaatcatgggtcctac		
5	TSC1-5F	tgacccttgctttacattag		429	50
	TSC1-5R	aatgttgccagagtggta	taccaactctggacaacatt		
6	TSC1-6F	aatccttagggatagggaaa		463	50
	TSC1-6R	tccactacaggcacatagaa	ttctatgtgcctgtaggtgga		
7	TSC1-7F	ttggagtgaggtgggaata		368	50
	TSC1-7R	tatttaacggcagacaggga	tcctgtctgccgttaaata		
8	TSC1-8F	gtgactggcttcttctc		371	58
	TSC1-8R	cacttggaagcactcataca	tgtatgagtgttccaagt		
9	TSC1-9F	gcactgagttgacactctga		398	50
	TSC1-9R	cttaaatgtcatgtccctc	gagggacatgcaaatttaag		
10	TSC1-10F	ccagaataacctaaccac		340	50
	TSC1-10R	ctgtgcctcttagattcat	atgaatctaagggaacag		
11	TSC1-11F	cactggccatggatataaac		320	50
	TSC1-11R	acacttattgcaaatccctg	cagggatttgcaataagtgt		
12	TSC1-12F	ccagaaagtaactctagca		322	50
	TSC1-12R	ttgagaagcctaattatgcc	ggcataattaggcttctcaa		
13	TSC1-13F	catccaacaatttgagaat		308	50
	TSC1-13R	tccaaaatactgaggcctaa	ttaggcctcagtattttgga		
14	TSC1-14F	ttgtagtatccccaggacag		324	50
	TSC1-14R	gacctatgccaggtaaatgtg	cactttacctggcataggtc		
15	TSC1-15F	tgccacttttctctctc		780	60
	TSC1-15R	atcattcttcacactccac	gtgggagtgtgaagaatgat		
16	TSC1-16F	ctgcaataaaaagtcaga		219	50
	TSC1-16R	cctctgggaacagatctc	gagatctgtttccagagg		
17	TSC1-17F	agctaacaacacatgggaag		390	50
	TSC1-17R	caggctgcttgagattaaga	tcttaatctcaagcgacctg		
18	TSC1-18F	aatgttcgcagtgtgtgta		383	50
	TSC1-18R	gctgaatgcttttctctctg	cagagagaaaagcattcagc		

19	TSC1-19F	aaagtagagccgttgagcta		331	50
	TSC1-19R	cttgagtgtctgtgtcatgg	ccatgacacagacactcaag		
20	TSC1-20F	cctagctgattccctgttta		321	50
	TSC1-20R	tatttcctaaaagacggagc	gctccgtcttttaggaaata		
21 & 22	TSC1- 2122F	tgcttctcagtcctcttta		638	50
	TSC1-2122R	actagacaggtgcaacact	agtgttcagcctgtctagt		
23	TSC1-23F	tagcggagttcagtgctcagt		745	50
	TSC1-23R	caagttcatgtgtggaaatg	cattccacacatgaacttg		

使用 GoTaq® DNA Polymerase system

(2) *TSC1*, *PKD1* PCR primers

Exon No.	name	forward	reverse	size	Tm
1	TSC2-1F-1	gcttctcaggtgcctgtttg		548	60
	TSC2-1R-1	gacctggttcaggcacactt	aagtgtgcctgaaccaggctc		
2	TSC2-2F-1	tcaagtgaatcttgattccagaaag		738	60
	TSC2-2R-1	caatcaagcgtggaaatgggg	ccccatttcacgcttgattg		
3	TSC2-3F	gttggtctcctcctgtcc		333	60
	TSC2-3R	acagggtctaggggctga	tcagcccctagaccctgt		
4	TSC2-4F	ctctgtgggaaggagagg		398	60
	TSC2-4R	gtatgccaccctgcttc	gaagcagggtgggcatac		
5	TSC2-5F-1	caggagtctggtgatgcgg		508	60
	TSC2-5R-1	gctcgcagtgataaaagttgaa	ttcaactttattactgcggagc		
6	TSC2-6F	atgagccatgcgtgttat		280	53
	TSC2-6R	aagctgctcggctctct	agagagaccgagcagctt		
7	TSC2-7F-1	tcaatgaccacagtgacagg		538	62
	TSC2-7R-1	gtctttgggaggagatggtgg	ccaccatctcctcccaaagac		
8	TSC2-8F-1	gtgtcattttccaggcagt		417	60-65
	TSC2-8R-1	gttccagagggtgccactag	ctagtggcagcctctggaac		
9	TSC2-9F	gcaacctcacatccat		322	55
	TSC2-9R	catttctagccctttcca	tggaaggcctagaaatg		
10	TSC2-10F	ctctcgggtccaagg		369	55
	TSC2-10R	tctctggtgattgcagt	actgcgaatcaccagaga		
11	TSC2-11F	ctgagggtgtctccatgc		369	58
	TSC2-11R	ctttccaggtttctgcac	gtgcagaaacctggaaag		
12	TSC2-12F-1	caggcttttccatgggtttgg		459	62
	TSC2-12R-1	tagcttgctttccagtcacg	gctggactggaaagcaagcta		

Exon No.	name	forward	reverse	size	Tm
13	TSC2-13F-1	ggctcaggatgcccgatg		536	60
	TSC2-13R-1	cgtggtctgtttaccctgt	acaggggttaaagaccacag		
14	TSC2-14F	cctgaggaattggaagtgc		351	55
	TSC2-14R	ggctgtgtccgtaggtgagg	cctcacctacggacacagcc		
15	TSC2-15F-1	ttctgcacagtcactcgggta		981	66
	TSC2-15R-1	caccctccctggatttgcgtg	cagcaaatccagggagggtg		
16	TSC2-16F-1	gggtttgaaggctgtgtgtt		468	60
	TSC2-16R-1	tctgtgcttgcgtcttaa	ttagagcgacaagccacaga		
17&18	TSC2-1718F-1	atcagcaggtggcctttctg		675	60
	TSC2-1718R-1	tcctcagagctgagccttc	gaaggctcagctctgaggga		
19	TSC2-19F-1	tagcttcgcctctgtctcta		506	62
	TSC2-19R-1	tgtgttacttggcaggcactc	gagtgcctgccaagtaacaca		
20	TSC2-20F	actcccaccactccgaaagg		380	60
	TSC2-20R	cccaggtaggccccacattt	aaatgtggggcctacctggg		
21	TSC2-21F	gcattcagggaacttgcta		403	60
	TSC2-21R	cctctctcaggactccttg	caaggagtctgagagagg		
21-1	TSC2-21-1F	aggcattcagggaacttgcta		543	60
	TSC2-21-2R	gtgaacgtctctcctgaag	ctcaaggaggagcgttcac		
22&23	TSC2-2223F	ttctctctctgcagcac		576	55
	TSC2-2223R	cagagtgcaggcagggtg	cacctgcctgtcactctg		
24	TSC2-24F	ctagcctgcagcttgcc		297	56
	TSC2-24R	aagtcagtgcagtgaaat	atttcactcactgactt		
25	TSC2-25F	gggatctctccatcctga		344	55
	TSC2-25R	ctgcttgcatgacctcat	atgaggctcatgcaagcag		
26-28	TSC2-2628F	tttgcccttggtgatag		782	60
	TSC2-2628R	ctgctggctccagtgctc	gaacactgggaccagcag		
29	TSC2-29F-1	gttactgaggccagcact		486	60
	TSC2-29R-1	cccccaaatatccaagaggg	cccccaaatatccaagaggg		
30	TSC2-30F-1	gtgcaagagtaggggtcca		690	60
	TSC2-30R-1	gtctgccctgctcaggaa	ttcctgagcagggcagac		
31	TSC2-31F	cctgcctctctctctg		239	55
	TSC2-31R	ataggtgctgtgctcgtc	gacgagcacagcacctat		
32	TSC2-32F-1	tgccctctggcaggagaag		445	60
	TSC2-32R-1	gggatgctgatacctctgctc	gagcagaggtatcagcatccc		
33	TSC2-33F	caccacctcagggtcaac		730	60

Exon No.	name	forward	reverse	size	Tm
	TSC2-33R	tggccaggctctgtgt	acacagagcctggcca		
34&35	TSC2-3435F	tctgtgttctccctgtg		556	60
	TSC2-3435R	acagagctcaacactgcc	ggcagtgttgagctctgt		
36	TSC2-36F	ggaatggatggctctgtctg		392	60
	TSC2-36R	ccatccagtctctgctacccc	ggggtagcaggactggatgg		
37	TSC2-37F	cagagcccttgagtaat		350	55
	TSC2-37R	<u>aggagcaggaggagagggc</u>	gcctctctctctgctct		
38	TSC2-38F	aaagttcaggggcagatgct		362	60
	TSC2-38R	agatcgtgtctgaccgcaac	gttgcggtcagacacgatct		
38&41	TSC2-3841F-1	gctgacaggtgtctagcagtg		983	60
	TSC2-3841R-1	ttgactttgtctgcttggtgc	gcaccaagcagacaaagtaa		
1-16 del	TSC2-320-del-2F	tcttagcctggatggcttgat		418	63
	TSC2-320-del-2R	caaagcctcacagcatcactt	aagtgatgctgtgaggctttg		
1-del	TSC2-057-del-1F	gctccgagcatcccttagttt		190	60
	TSC2-057-del-1R	ctacctctgcctcccagtttc	gaaactgggaggcagaggtag		
6-16 dup	TSC2-224-dup-1F	tcactcgggtataaaggcat		574	60
	TSC2-224-dup-1R	aatgttgcatgagctctgtctca	tgagacagagctcatgcaacatt		
whole <i>TSC2</i> deletion	TSC338-TSC2-F2	gcgtgtaatcccagcacttt		481	60
	TSC338-TSC2-R		tgtgctgcttctgtgtacc		
15	TSC338-PKD1-ex15-F	ccgtcaccttctacccgcaccc		365	60
	TSC338-PKD1-ex15-R		cacatgctccactgttgctcc		

使用 GoTaq® DNA Polymerase system

(3) Minigene PCR primers for insert DNA

primer	sequence	size of product	program
TSC144-TSC2-ex18-20-DNA-F	ggagacccaagctgggaccttgacttctgttgc	884 bp	AccuPrime Taq
TSC144-TSC2-ex18-20-DNA-R	gccctctagactcgacatggagcagagagcagagc		
TSC203-TSC2-ex11-13-DNA-F	ggagacccaagctgggcatggcatgtccgaacga	1961 bp	PrimeSTAR GXL
TSC203-TSC2-ex11-13-DNA-R	gccctctagactcgactgaagaatctctccatcagcg		
TSC270-TSC2-ex39-41-DNA-F	ggagacccaagctggggccagtcaactttgtccacg	493 bp	AccuPrime Taq
TSC270-TSC2-ex39-41-DNA-R	gccctctagactcgaccgctggcggagccgcttgat		
TSC201-TSC2-ex1-3-DNA-F	ggagacccaagctggcgttttctgcttggggcgaaa	3052 bp	PrimeSTAR GXL
TSC201-TSC2-ex1-3-DNA-R1	gccctctagactcgactcttcaaatttctt ggtttttgcgacttcacaaatctgccc		
TSC160-TSC1-ex7-9-DNA-F	ggagacccaagctggggccacgtggcggagagtctat	9722 bp	TaKaRa LA Taq
TSC160-TSC1-ex7-9-DNA-R	gccctctagactcgacatagctattctgtgtgcagc		

(4) PCR programs

1. GoTaq® DNA Polymerase system

GoTaq® DNA Polymerase	12.5 μ l	95 °C, 5 min	} 30 cycles
primer-F (10 mM)	1 μ l	95 °C, 30 sec	
primer-R (10 mM)	1 μ l	Tm °C, 30 sec	
DNA template (100 ng/ μ L)	1 μ l	72 °C, 30 sec	
ddH2O	9.5 μ l	72 °C, 5 min	
total	25 μ l	4 C, ∞	



2. AccuPrime™ Taq DNA Polymerase system

AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	1 μ l	94 °C, 2 min	} 30 cycles
10X AccuPrime™ PCR buffer II	5 μ l	94 °C, 30 sec	
primer-F (10 mM)	1 μ l	65 °C, 30 sec	
primer-R (10 mM)	1 μ l	68 °C, 2 min	
DNA template (50 ng/ μ L)	1 μ l	68 °C, 5 min	
ddH ₂ O	41 μ l	4 C, ∞	
total	50 μ l		

3. PrimeSTAR GXL DNA Polymerase system

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	1 μ l	98 °C, 3 min	} 35 cycles
5X buffer	10 μ l	98 °C, 30 sec	
DMSO	2.5 μ l	68 °C, 5 min	
Betamine (5M)	5 μ l	72 °C, 2 min	
dNTP (2.5 mM)	4 μ l	4 C, ∞	
primer-F (10 mM)	1 μ l		
primer-R (10 mM)	1 μ l		
DNA template (50 ng/ μ L)	2 μ l		
ddH ₂ O	23.5 μ l		
total	50 μ l		

4. TaKaRa LA Taq DNA Polymerase system

TaKaRa LA Taq (5U/ μ L)	0.5 μ l	95 °C, 1 min	} 35 cycles
10X LA buffer II (Mg ²⁺ free)	5 μ l	95 °C, 20 sec	
MgCl ₂ (2.5mM)	5 μ l	68 °C, 18 min	
dNTP (2.5 mM)	8 μ l	68 °C, 20 min	
primer-F (10 mM)	1 μ l		
primer-R (10 mM)	1 μ l		
DNA template (50 ng/ μ L)	2 μ l		
ddH ₂ O	28 μ l		
total	50 μ l		

(5) minigene primers for Sanger sequencing

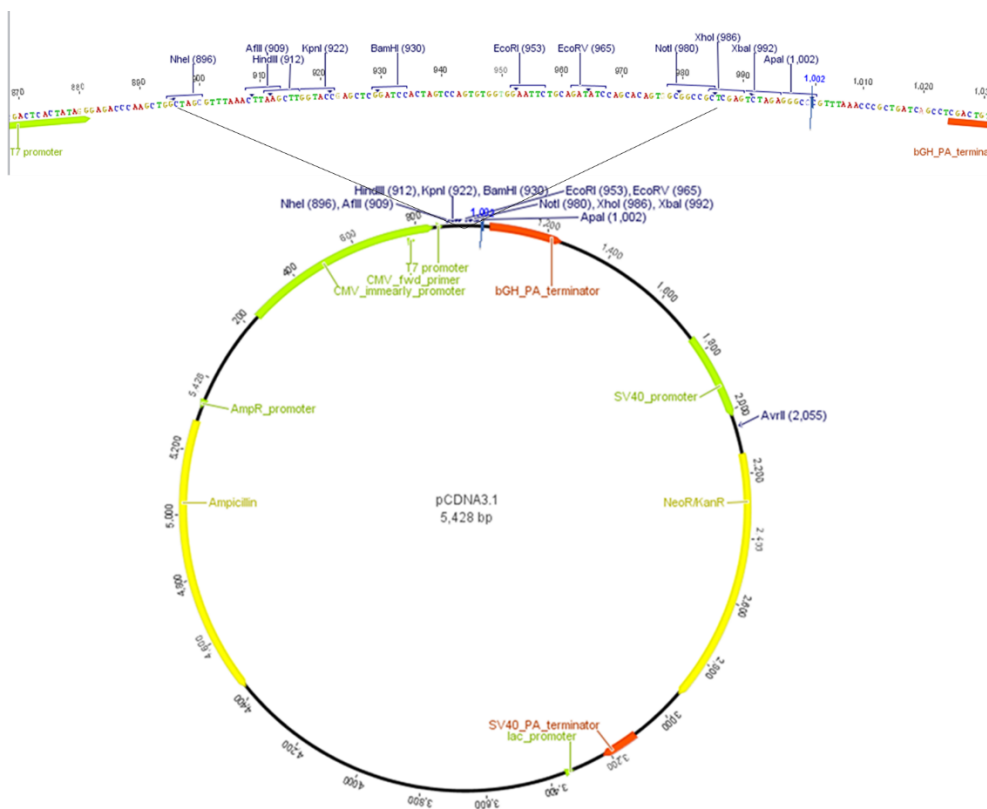
case		primer	sequence
TSC144	1	TSC144-TSC2-ex18-R	ggatgtcccagggttgggaa
	2	1718R-1	gaaggctcagctctgaggga
	3	19F-1	tagcttccgctctgtctcta
	4	TSC144-TSC2-ex18-20-DNA-R	gccctctagactcgacatggagcagagagcagagc
TSC160	1	TSC160-TSC1-ex7-9-DNA-F	ggagaccaagctgggccacgtggcggaagtctat
	2	TSC1-7R	tccctgtctgccgtaaata
	3	TSC1-8F	gtgactggcttcttctcactc
	4	TSC160-TSC1-in8-F1	ccagttgactataccatcct
	5	TSC160-TSC1-in8-F2	agctagttagctaggagg
	6	TSC160-TSC1-in8-F3	gctgtcatcctagtctcct
	7	TSC160-TSC1-in8-F4	ctgttggtacagttactgc
	8	TSC160-TSC1-in8-F5	ctatagagaataatccaggt
	9	TSC160-TSC1-in8-F6	gcatatgtaagcatcaggatgc
	10	TSC160-TSC1-in8-F7	ggattgaaggatatgagt
	11	TSC160-TSC1-in8-F8	catagtatactctgtggct
	12	TSC160-TSC1-in8-F9	ctagtcattgctgagaatgc
	13	TSC160-TSC1-in8-F10	gctcaagtgtatcctctgct
	14	TSC160-TSC1-in8-F11	gctgagattacaggtacgagc
	15	TSC160-TSC1-in8-F12	gcagtgagtcgagattgc
	16	TSC160-TSC1-in8-F13	gcagatcgatagttgcaag
	17	TSC1-9F	gcactgagttgacactctga
	18	TSC160-TSC1-ex7-9-DNA-R	gccctctagactcgacatagctattctgtgtgtcagc
TSC201	1	TSC201-TSC2-ex1-R1	agcgcgaggatgctgacc
	2	TSC201-TSC2-ex1-R2	atgctcggagctccggag
	3	TSC201-TSC2-in1-F1	ggttaagtggcgggtcc
	4	TSC201-TSC2-in1-F2	gtcttgaccaggttctgt
	5	TSC201-TSC2-in1-F3	ggctggcttgaactgct
	6	TSC2-1R-1	aagtgtgcctgaaccaggtc
	7	TSC2-2F-1	tcaagtgaatcttgattccagaaag
	8	TSC201-TSC2-ex1-3-DNA-R1	gccctctagactcgactcttcaatttcttgg tttttgcgacttcacaaatctgccc
TSC203	1	TSC203-TSC2-ex11-13-DNA-F	ggagaccaagctgggccatggcatgtccgaacga

	2	TSC2-10R	actgcgaatcaccagaga
	3	TSC203-TSC2-in11-F	gctagtatccagcagcct
	4	TSC2-11F	ctgagggtgtctccatgc
	5	TSC2-12F-1	caggcttttccatgggtttgg
TSC270	1	TSC270-TSC2-ex39-41-DNA-F	ggagacccaagctggggccagttcaactttgtccacg
	2	TSC270-TSC2-ex39-41-DNA-R	gccctctagactcgaccgctggcggagccgcttgat

附錄三、minigene assay 實驗流程

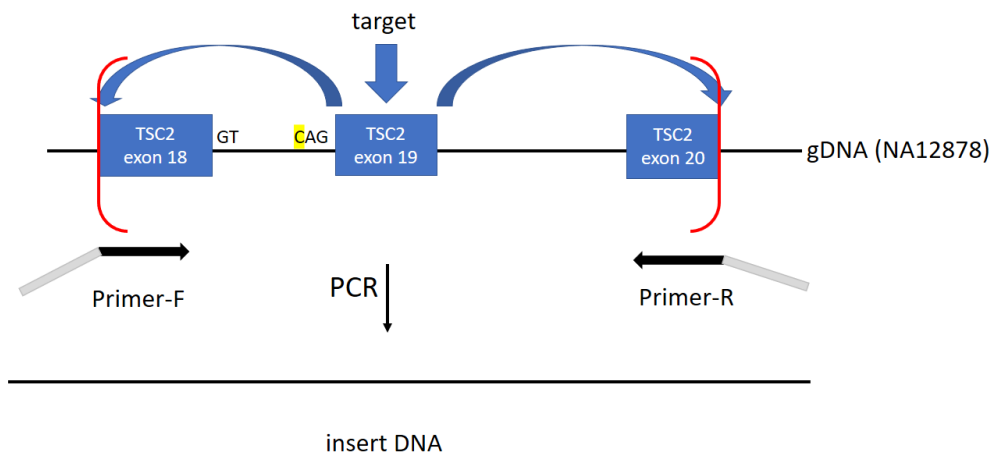
1. 準備 linearized vector 和 insert DNA

利用 pcDNA3.1，為約 5.4kb 的載體 (vector)，上面已設計了多種限制酶切位，本實驗利用的是其中的 NheI 和 XhoI 兩個限制酶切位。先用 NheI 和 XhoI 限制酶將載體 (vector) 切開成線狀。



使用 NA12878 標準品之 genomic DNA，在待測上下游剪接位變異點旁之外顯子，往上游和下游各一個外顯子的區域，做為目標要 clone 入 pcDNA3.1 的

insert DNA。在設計 PCR 引子的時候，引子兩邊會額外帶有一段 15bp 和 pcDNA3.1 要 clone 入 insert DNA 的接點兩旁周圍互補的序列，以備之後 cloning 的進行。PCR 出的產物以 PCR clean up and Gel Extraction kit from Omics Bio 進行純化。



2. 將 insert DNA clone 入 linearized vector

利用 In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara)，進行 Gibson assembly。將 5X In-Fusion HD Enzyme Premix、linearized vectors (100 ng, <10 kb)、PCR-generated sequences (100 ng, 0.5 to 10 kb)、ddH₂O 混合成 10μl，在 50 °C 乾浴槽作用 15 分鐘，置於冰上作用 5 分鐘，混勻。

將產物分為兩組，其中一組利用 Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit 接著進行 mutagenesis，製造出欲測試的變異點位。

3.transformation to DH5α *E. coli* competent cells

將 10 μL Gibson assembly reaction mixture 加入 DH5α *E. coli* competent Cell，置於冰上 30 分鐘，於 42 °C 水浴 45 秒進行 heat shock 將 vector 吞入細胞，再置於冰上 5 分鐘。

加入 1 cc. S.O.C medium，置於 30 °C 下 30 分鐘 225 rpm，促使細菌開始表現抗藥性基因。取 100 μL ~ 120 μL 菌液至 LB plate 塗盤，在 30 °C 下培養至隔夜。



4.colony PCR 確認 insert DNA 是否接入 vector

挑選數顆 colony，用 tip 沾取部分菌，於裝有 10.5 μ l ddH₂O 的 eppendorf 中混和均勻，再加入針對目標外顯子的 PCR 引子：1 μ l primer-F 和 1 μ l primer-R，以及 12.5 μ l GoTaq® Green Master Mix，進行 PCR，並電泳確認產物大小正確，表示 insert DNA 有接入 vector。確認有接入 vector 的菌落，挑菌種在 5cc LB broth，並添加額外 15 μ l ampicillin (150 μ g/ml)，於 30°C 225 rpm 培養至隔夜。

PCR program: 94°C 3'
 94°C 30''/ 60°C 30''/ 72°C 2'50 (32 cycles)
 72°C 5'
 16°C ∞

5.plasmid extraction 及桑格定序

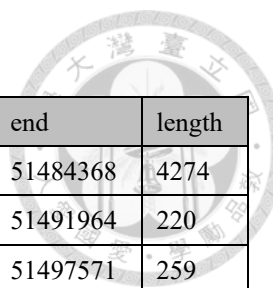
使用 low endotoxin mini from Omic Bio kit 萃取 plasmid。取 5cc LB broth (with ampicillin) 菌液，離心 4000 rpm 10 分鐘，去除上清液，加入 200 μ l MXB1 buffer，混和均勻，移入 1.5ml eppendorf；加入 250 μ l MXB2，輕輕上下翻轉 4~6 次，靜置室溫 5min；加入 350 μ l MXB3 中和 lysate，輕輕上下翻轉 4~6 次直至白色沉澱物出現。離心 13000rpm 10min，上清液移置 column 中，離心 9000rpm 60 sec；加入 500 μ l WE buffer，離心 9000rpm 60sec，丟棄過濾液；加入 700 μ l WS buffer，離心 9000rpm 60sec，丟棄過濾液體；離心 13000rpm 3min，去除酒精，將 column 移置 1.5ml eppendorf；加 50 μ l ddH₂O 至 membrane 正中央回溶，靜置 3 min，離心 13000 rpm 3min，測 O.D，-20°C 保存。取部分以限制酶 NheI 和 XhoI 切割，電泳跑膠，送桑格定序，確認序列無誤。

6.transfection to HEK293

使用 Lipofectamine 3000 Reagent kit，取 8.25 μ l Lipofectamine™ 3000 Reagent

於 1.5ml eppendorf，並以 250 μ l Opti-MEM™ (Reduced Serum Medium)稀釋後混勻；取 5.5 μ g DNA 於 250 μ l Opti-MEM™稀釋於 1.5ml eppendorf，加入 11 μ l P3000™ Reagent 混勻。再將以上兩管相加混和均勻(DNA-lipid complex)，室溫放置 10 min。

將細胞株 HEK293 (Human embryonic kidney cells 293)，以 PBS wash 乾淨，每盤加入 4 CC serum free medium。再加入上述 DNA-lipid complex，培養 24hr 後換成含有 serum 的 medium。於培養 48hr 抽 RNA。萃取 RNA 後進行 RT-PCR，最後送桑格定序，觀察序列剪接狀況。



附錄三、TSC panel

chr	NM_number_gene name	start	end	length	chr	NM_number_gene name	start	end	length
chr9	NM_000368_TSC1	135746734	135870020	123286	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_67	51480094	51484368	4274
chr16	NM_000548_TSC2	2047895	2158721	110826	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_66	51491744	51491964	220
chr16	NM_000296_PKD1	2138710	2195899	57189	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_65	51497312	51497571	259
chr17	NM_144606_FLCN	17105526	17160502	54976	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_64	51503596	51503804	208
chr1	NM_004958_MTOR_exon_58	11166537	11167607	1070	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_63	51512778	51512966	188
chr1	NM_004958_MTOR_exon_57	11168187	11168393	206	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_62	51513832	51514068	236
chr1	NM_004958_MTOR_exon_56	11169296	11169477	181	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_61	51523699	51524817	1118
chr1	NM_004958_MTOR_exon_55	11169655	11169836	181	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_60	51609132	51609390	258
chr1	NM_004958_MTOR_exon_54	11172858	11173024	166	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_59	51611468	51611737	269
chr1	NM_004958_MTOR_exon_53	11174324	11174560	236	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_58	51612534	51613513	979
chr1	NM_004958_MTOR_exon_52	11174819	11174994	175	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_57	51617948	51618201	253
chr1	NM_004958_MTOR_exon_51	11175402	11175575	173	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_56	51619531	51619786	255
chr1	NM_004958_MTOR_exon_50	11177010	11177193	183	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_55	51637449	51637637	188
chr1	NM_004958_MTOR_exon_49	11181252	11181475	223	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_54	51640555	51640769	214
chr1	NM_004958_MTOR_exon_48	11181985	11182233	248	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_53	51655983	51656221	238
chr1	NM_004958_MTOR_exon_47	11184504	11184740	236	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_52	51695608	51695837	229
chr1	NM_004958_MTOR_exon_46	11186628	11186903	275	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_51	51701151	51701317	166
chr1	NM_004958_MTOR_exon_45	11187016	11187251	235	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_50	51712522	51712818	296
chr1	NM_004958_MTOR_exon_44	11187630	11187913	283	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_49	51720640	51720918	278
chr1	NM_004958_MTOR_exon_43	11188010	11188233	223	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_48	51732610	51732957	347

chr1	NM_004958_MTOR_exon_42	11188460	11188659	199	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_47	51735251	51735487	236
chr1	NM_004958_MTOR_exon_41	11188861	11189058	197	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_46	51747840	51748075	235
chr1	NM_004958_MTOR_exon_40	11189744	11189945	201	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_45	51750614	51750820	206
chr1	NM_004958_MTOR_exon_39	11190535	11190884	349	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_44	51751880	51752093	213
chr1	NM_004958_MTOR_exon_38	11193086	11193304	218	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_43	51768344	51768575	231
chr1	NM_004958_MTOR_exon_37	11194357	11194573	216	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_42	51768733	51768890	157
chr1	NM_004958_MTOR_exon_36	11199310	11199542	232	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_41	51770962	51771188	226
chr1	NM_004958_MTOR_exon_35	11199539	11199765	226	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_40	51774030	51774322	292
chr1	NM_004958_MTOR_exon_34	11204654	11204862	208	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_39	51776546	51776804	258
chr1	NM_004958_MTOR_exon_33	11204974	11205152	178	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_38	51777113	51777424	311
chr1	NM_004958_MTOR_exon_32	11206682	11206898	216	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_37	51798857	51799170	313
chr1	NM_004958_MTOR_exon_31	11210132	11210333	201	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_36	51824617	51824874	257
chr1	NM_004958_MTOR_exon_30	11217158	11217398	240	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_35	51875056	51875307	251
chr1	NM_004958_MTOR_exon_29	11227448	11227624	176	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_34	51882157	51882477	320
chr1	NM_004958_MTOR_exon_28	11259264	11259510	246	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_33	51887548	51887792	244
chr1	NM_004958_MTOR_exon_27	11259547	11259810	263	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_32	51889321	51891029	1708
chr1	NM_004958_MTOR_exon_26	11264567	11264810	243	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_31	51892576	51892744	168
chr1	NM_004958_MTOR_exon_25	11269318	11269565	247	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_30	51892903	51893199	296
chr1	NM_004958_MTOR_exon_24	11270820	11271013	193	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_29	51897777	51898013	236
chr1	NM_004958_MTOR_exon_23	11272318	11272581	263	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_28	51900338	51900569	231
chr1	NM_004958_MTOR_exon_22	11272802	11273015	213	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_27	51907606	51907982	376
chr1	NM_004958_MTOR_exon_21	11273405	11273673	268	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_26	51908372	51908578	206

chr1	NM_004958_MTOR_exon_20	11276154	11276341	187	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_25	51909713	51909936	223
chr1	NM_004958_MTOR_exon_19	11288674	11289025	351	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_24	51910751	51911036	285
chr1	NM_004958_MTOR_exon_18	11290931	11291161	230	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_23	51913239	51913467	228
chr1	NM_004958_MTOR_exon_17	11291306	11291541	235	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_22	51914904	51915143	239
chr1	NM_004958_MTOR_exon_16	11292442	11292635	193	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_21	51917823	51918099	276
chr1	NM_004958_MTOR_exon_15	11293404	11293594	190	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_20	51918785	51919013	228
chr1	NM_004958_MTOR_exon_14	11294149	11294372	223	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_19	51920334	51920577	243
chr1	NM_004958_MTOR_exon_13	11297849	11298155	306	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_18	51921445	51921636	191
chr1	NM_004958_MTOR_exon_12	11298408	11298724	316	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_17	51921637	51921827	190
chr1	NM_004958_MTOR_exon_11	11300309	11300654	345	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_16	51923070	51923449	379
chr1	NM_004958_MTOR_exon_10	11301559	11301788	229	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_15	51924675	51924890	215
chr1	NM_004958_MTOR_exon_9	11303120	11303407	287	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_14	51927266	51927508	242
chr1	NM_004958_MTOR_exon_8	11307631	11307840	209	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_13	51929702	51929898	196
chr1	NM_004958_MTOR_exon_7	11307825	11308201	376	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_12	51930723	51930925	202
chr1	NM_004958_MTOR_exon_6	11313845	11314080	235	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_11	51934204	51934375	171
chr1	NM_004958_MTOR_exon_5	11315998	11316299	301	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_10	51935153	51935293	140
chr1	NM_004958_MTOR_exon_4	11316939	11317272	333	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_9	51935753	51935918	165
chr1	NM_004958_MTOR_exon_3	11318491	11318700	209	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_8	51936862	51937037	175
chr1	NM_004958_MTOR_exon_2	11319254	11319530	276	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_7	51938210	51938389	179
chr1	NM_004958_MTOR_exon_1	11322451	11322658	207	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_6	51941023	51941181	158
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_1	57110939	57111204	265	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_5	51944647	51944856	209
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_2	57140003	57140245	242	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_4	51947139	51947390	251

chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_3	57157016	57157210	194	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_3	51947925	51948103	178
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_4	57157980	57158225	245	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_2	51949629	51949865	236
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_5	57159387	57159575	188	chr6	NM_138694_PKHD1_exon_1	51952181	51952473	292
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_6	57161557	57161882	325	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_1	120885844	120886258	414
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_7	57169593	57170198	605	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_2	120977421	120977700	279
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_8	57171714	57171941	227	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_3	121013713	121013999	286
chr1	NM_006252_PRKAA2_exon_9	57173097	57181058	7961	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_4	121015165	121015400	235
chr2	NM_005544_IRS1_exon_2	227595982	227601016	5034	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_5	121018993	121019164	171
chr2	NM_005544_IRS1_exon_1	227659654	227663556	3902	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_6	121021217	121021422	205
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_26	171318144	171321142	2998	chr8	NM_001283012_DEPTOR_exon_7	121061764	121063207	1443
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_25	171323038	171323256	218	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_12	128199622	128201341	1719
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_24	171330018	171330272	254	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_11	128206729	128206927	198
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_23	171338125	171338360	235	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_10	128230200	128230438	238
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_22	171360579	171360729	150	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_9	128246671	128246912	241
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_21	171362649	171362863	214	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_8	128268538	128268746	208
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_20	171376952	171377141	189	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_7	128305287	128305497	210
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_19	171379799	171380010	211	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_6	128321861	128322138	277
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_18	171392239	171392453	214	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_5	128347783	128348056	273
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_17	171394454	171394673	219	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_4	128419879	128420128	249
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_16	171395305	171395534	229	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_3	128432046	128432236	190
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_15	171405110	171405424	314	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_2	128434544	128434972	428
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_14	171406415	171406716	301	chr9	NM_001006617_MAPKAP1_exon_1	128469199	128469563	364

chr3	NM_001130081_PLD1_exon_13	171410071	171410282	211	chr10	NM_000314_PTEN_exon_1	89623144	89624355	1211
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_12	171417484	171417666	182	chr10	NM_000314_PTEN_exon_2	89653731	89653916	185
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_11	171426494	171426678	184	chr10	NM_000314_PTEN_exon_3	89685219	89685364	145
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_10	171427299	171427549	250	chr10	NM_000314_PTEN_exon_4	89690752	89690896	144
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_9	171431632	171431885	253	chr10	NM_000314_PTEN_exon_5	89692719	89693058	339
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_8	171442435	171442628	193	chr10	NM_000314_PTEN_exon_6	89711824	89712066	242
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_7	171443757	171443916	159	chr10	NM_000314_PTEN_exon_7	89717559	89717826	267
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_6	171451183	171451349	166	chr10	NM_000314_PTEN_exon_8	89720600	89720925	325
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_5	171452604	171452810	206	chr10	NM_000314_PTEN_exon_9	89724993	89731737	6744
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_4	171453231	171453477	246	chr10	NM_019058_DDIT4_exon_1	74033626	74033868	242
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_3	171455271	171455499	228	chr10	NM_019058_DDIT4_exon_2	74033864	74034229	365
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_2	171455631	171455922	291	chr10	NM_019058_DDIT4_exon_3	74034402	74035844	1442
chr3	NM_001130081_PLD1_exon_1	171528138	171528334	196	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_1	2255127	2255563	436
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_11	119540751	119545752	5001	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_2	2256011	2256265	254
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_10	119562051	119562250	199	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_3	2256308	2256460	152
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_9	119582215	119582502	287	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_4	2256447	2256710	263
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_8	119595209	119595405	196	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_5	2256985	2257161	176
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_7	119624551	119624749	198	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_6	2257143	2257396	253
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_6	119631500	119631707	207	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_7	2258160	2258385	225
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_5	119634840	119635071	231	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_8	2258400	2258664	264
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_4	119642169	119642380	211	chr16	NM_001199173_MLST8_exon_9	2258709	2259468	759
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_3	119666064	119666248	184	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_12	135753	136919	1166

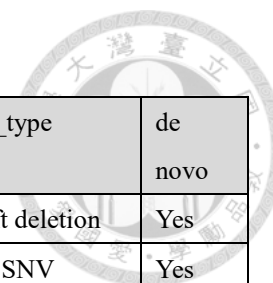
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_2	119720842	119721136	294	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_11	138646	138822	176
chr3	NM_001146156_GSK3B_exon_1	119812143	119813314	1171	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_10	138722	138938	216
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_1	178866260	178866441	181	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_9	139660	139950	290
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_2	178916487	178917015	528	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_8	142543	142773	230
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_3	178917427	178917737	310	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_7	143166	143373	207
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_4	178919027	178919378	351	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_6	148092	148349	257
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_5	178921281	178921627	346	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_5	150319	150557	238
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_6	178922240	178922426	186	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_4	160472	160654	182
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_7	178927332	178927538	206	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_3	162570	162824	254
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_8	178927923	178928176	253	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_2	180470	180640	170
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_9	178928168	178928403	235	chr16	NM_001039476_NPRL3_exon_1	188098	188747	649
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_10	178935947	178936172	225	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_1	57970356	57970736	380
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_11	178936933	178937115	182	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_2	57987872	57988022	150
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_12	178937308	178937573	265	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_3	57989994	57990215	221
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_13	178937686	178937890	204	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_4	58003745	58003993	248
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_14	178938723	178938995	272	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_5	58007427	58007585	158
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_15	178941818	178942025	207	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_6	58008932	58009133	201
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_16	178942437	178942659	222	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_7	58011480	58011671	191
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_17	178943699	178943878	179	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_8	58011744	58011935	191
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_18	178947009	178947280	271	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_9	58012503	58012711	208
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_19	178947741	178947959	218	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_10	58013525	58013688	163
chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_20	178947962	178948214	252	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_11	58013774	58013952	178

chr3	NM_006218_PIK3CA_exon_21	178951831	178957931	6100	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_12	58018146	58018354	208
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_11	50384868	50385154	286	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_13	58022716	58022929	213
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_10	50385139	50385382	243	chr17	NM_001272042_RPS6KB1_exon_14	58023861	58027836	3975
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_9	50385504	50385722	218	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_1	78518574	78519641	1067
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_8	50385697	50385891	194	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_2	78599440	78599643	203
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_7	50385907	50386044	137	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_3	78617477	78617660	183
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_6	50386065	50386263	198	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_4	78681590	78681849	259
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_5	50386254	50386491	237	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_5	78704309	78704556	247
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_4	50386766	50386975	209	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_6	78727759	78728035	276
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_3	50387045	50387314	269	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_7	78765199	78765359	160
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_2	50387311	50387503	192	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_8	78795950	78796151	201
chr3	NM_006545_NPRL2_exon_1	50387955	50388536	581	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_9	78796828	78797073	245
chr4	NM_000297_PKD2_exon_1	88928748	88929530	782	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_10	78811671	78811847	176
chr4	NM_000297_PKD2_exon_2	88940559	88940773	214	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_11	78820222	78820424	202
chr4	NM_000297_PKD2_exon_3	88957321	88957555	234	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_12	78829213	78829397	184
chr4	NM_000297_PKD2_exon_4	88959352	88959703	351	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_13	78831539	78831750	211
chr4	NM_000297_PKD2_exon_5	88964334	88964659	325	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_14	78865469	78865687	218
chr4	NM_000297_PKD2_exon_6	88967743	88968072	329	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_15	78866478	78866719	241
chr4	NM_000297_PKD2_exon_7	88973092	88973360	268	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_16	78867456	78867715	259
chr4	NM_000297_PKD2_exon_8	88977187	88977469	282	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_17	78882560	78882779	219
chr4	NM_000297_PKD2_exon_9	88979084	88979305	221	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_18	78896473	78896677	204
chr4	NM_000297_PKD2_exon_10	88983007	88983206	199	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_19	78897239	78897523	284

chr4	NM_000297_PKD2_exon_11	88986475	88986697	222	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_20	78899119	78899330	211
chr4	NM_000297_PKD2_exon_12	88986863	88987081	218	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_21	78914245	78914451	206
chr4	NM_000297_PKD2_exon_13	88988999	88989263	264	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_22	78919416	78919631	215
chr4	NM_000297_PKD2_exon_14	88995913	88996161	248	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_23	78920976	78921201	225
chr4	NM_000297_PKD2_exon_15	88996559	88998981	2422	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_24	78923192	78923397	205
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_39	38937972	38942530	4558	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_25	78931373	78931580	207
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_38	38942884	38943123	239	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_26	78933827	78934055	228
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_37	38944497	38944721	224	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_27	78935143	78935330	187
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_36	38944964	38945220	256	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_28	78936210	78936427	217
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_35	38945542	38945876	334	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_29	78936677	78936907	230
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_34	38946519	38946704	185	chr17	NM_001163034_RPTOR_exon_30	78938011	78940223	2212
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_33	38947315	38947593	278	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_9	18642511	18643115	604
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_32	38949407	38949579	172	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_8	18643423	18643655	232
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_31	38949763	38950872	1109	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_7	18644029	18644207	178
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_30	38952247	38952577	330	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_6	18648360	18648633	273
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_29	38953036	38953243	207	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_5	18648975	18649293	318
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_28	38953512	38953705	193	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_4	18650130	18650319	189
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_27	38954825	38955013	188	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_3	18650310	18650580	270
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_26	38955646	38955856	210	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_2	18652438	18652855	417
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_25	38957703	38957882	179	chr19	NM_001308373_FKBP8_exon_1	18654245	18654456	211
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_24	38958494	38958671	177	chr19	NM_001098632_AKT1S1_exon_5	50372239	50373367	1128
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_23	38958718	38958983	265	chr19	NM_001098632_AKT1S1_exon_4	50374753	50375023	270

chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_22	38959246	38959473	227	chr19	NM_001098632_AKT1S1_exon_3	50375018	50375196	178
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_21	38959830	38960130	300	chr19	NM_001098632_AKT1S1_exon_2	50376123	50376609	486
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_20	38960449	38960685	236	chr19	NM_001098632_AKT1S1_exon_1	50380231	50380694	463
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_19	38962366	38962513	147	chr20	NM_000801_FKBP1A_exon_5	1349570	1350766	1196
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_18	38962536	38962738	202	chr20	NM_000801_FKBP1A_exon_4	1352669	1352934	265
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_17	38962927	38963193	266	chr20	NM_000801_FKBP1A_exon_3	1356084	1356297	213
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_16	38964843	38965044	201	chr20	NM_000801_FKBP1A_exon_2	1373427	1373575	148
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_15	38966692	38966873	181	chr20	NM_000801_FKBP1A_exon_1	1373555	1373866	311
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_14	38967212	38967379	167	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_1	45064376	45064735	359
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_13	38967388	38967579	191	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_2	45098321	45098538	217
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_12	38967994	38968182	188	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_3	45110420	45110601	181
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_11	38971928	38972111	183	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_4	45121073	45121222	149
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_10	38975588	38975756	168	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_5	45122406	45122564	158
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_9	38978634	38978802	168	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_6	45127559	45127751	192
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_8	38981918	38982188	270	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_7	45128080	45128321	241
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_7	38991000	38991227	227	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_8	45130856	45131092	236
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_6	38996870	38997034	164	chr22	NM_001017528_PRR5_exon_9	45132601	45133611	1010
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_5	39002586	39002818	232	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_1	32149958	32150200	242
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_4	39003609	39003774	165	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_2	32150797	32151015	218
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_3	39021090	39021288	198	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_3	32154481	32154669	188
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_2	39074162	39074310	148	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_4	32156591	32156738	147
chr5	NM_001285439_RICTOR_exon_1	39074380	39074560	180	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_5	32160910	32161096	186

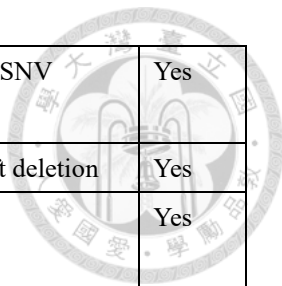
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_8	13305133	13305469	336	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_6	32162520	32162704	184
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_7	13306579	13306809	230	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_7	32164749	32164899	150
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_6	13307781	13308027	246	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_8	32174034	32174204	170
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_5	13316752	13316990	238	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_9	32179842	32180021	179
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_4	13321089	13321377	288	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_10	32180749	32180911	162
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_3	13325275	13325456	181	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_11	32187968	32188138	170
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_2	13326968	13327188	220	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_12	32188680	32188853	173
chr6	NM_001143964_TBC1D7_exon_1	13328497	13328865	368	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_13	32193535	32193739	204
chr7	NM_005614_RHEB_exon_8	151163047	151164347	1300	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_14	32194517	32194692	175
chr7	NM_005614_RHEB_exon_7	151167606	151167788	182	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_15	32198639	32198874	235
chr7	NM_005614_RHEB_exon_6	151168429	151168577	148	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_16	32200097	32200259	162
chr7	NM_005614_RHEB_exon_5	151168584	151168741	157	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_17	32200777	32200951	174
chr7	NM_005614_RHEB_exon_4	151174368	151174551	183	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_18	32202057	32202227	170
chr7	NM_005614_RHEB_exon_3	151181772	151181940	168	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_19	32205546	32205683	137
chr7	NM_005614_RHEB_exon_2	151187978	151188150	172	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_20	32206456	32206677	221
chr7	NM_005614_RHEB_exon_1	151216495	151217060	565	chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_21	32210927	32211248	321
					chr22	NM_001007188_DEPDC5_exon_22	32211351	32212027	676



附錄四、結節硬化症臨床確診家族之 proband 基因檢測結果

No.	family number	subject number	gene interpretation	method	gene	nucleic_acid	amino_acid	variation_type	de novo
1	TTF00001	TTSC00002	pathogenetic	NGS	2	c.2539delC	p.Leu847fs	frameshift deletion	Yes
2	TTF00002	TTSC00008	likely pathogenetic	NGS	2	c.4733T>G	p.Leu1578Arg	missense SNV	Yes
3	TTF00003	TTSC00009	pathogenetic	NGS	2	c.2438_2439insT	p.Val813fs	frameshift insertion	Yes
4	TTF00004	TTSC00014	pathogenetic	NGS	2	c.2824G>T	p.Glu942*	stopgain SNV	Yes
5	TTF00005	TTSC00016	pathogenetic	NGS	1	c.1888_1891delAAAG	p.Lys630fs	frameshift deletion	Yes
6	TTF00006	TTSC00022	pathogenetic	NGS	2	c.337-1G>A	-	splicing	-
7	TTF00007	TTSC00027	pathogenetic	NGS	2	c.5227C>T	p.Arg1743Trp	missense SNV	No
8	TTF00008	TTSC00028	no finding	NGS	-	-	-	-	-
9	TTF00009	TTSC00031	no finding	NGS	-	-	-	-	-
10	TTF00010	TTSC00033	pathogenetic	NGS	2	c.1851delC	p.Phe617fs	frameshift deletion	-
11	TTF00011	TTSC00038	pathogenetic	NGS	2	c.2837+1insG	NA	splicing	Yes
12	TTF00012	TTSC00041	no finding	NGS	-	-	-	-	-
13	TTF00013	TTSC00098	pathogenetic	NGS	2	c.1783C>T	p.Gln595*	stopgain SNV	Yes
14	TTF00014	TTSC00179	likely pathogenetic	NGS	2	c.1793A>G	p.Tyr598Cys	missense SNV	Yes
15	TTF00015	TTSC00053	pathogenetic	NGS	2	c.4569+1G>T	-	splicing	-
16	TTF00016	TTSC00056	pathogenetic	NGS	2	c.128_138+5del	p.Glu43fs	frameshift deletion	-
17	TTF00017	TTSC00057	pathogenetic	NGS, MLPA	2	c.1-281_138+370del (789bp)	-	large deletion	-

18	TTF00018	TTSC00058	pathogenetic	NGS	2	c.1564_1565dup	p.His523fs	frameshift insertion	Yes
19	TTF00020	TTSC00067	pathogenetic	NGS	2	c.1513C>T	p.Arg505*	stopgain SNV	Yes
20	TTF00021	TTSC00070	pathogenetic	NGS	2	c.1840-2A>T	-	splicing	-
21	TTF00023	TTSC00077	pathogenetic	NGS, MLPA	1	Whole gene deletion	-	large deletion	-
22	TTF00025	TTSC00085	pathogenetic	NGS	2	c.2974C>T	p.Gln992*	stopgain SNV	Yes
23	TTF00026	TTSC00087	likely pathogenetic	NGS	2	c.1075_1086del (12)	p.Asp359_Leu362del	in-frame deletion	Yes
24	TTF00027	TTSC00091	pathogenetic	NGS	2	c.1851delC	p.Phe617fs	frameshift deletion	Yes
25	TTF00028	TTSC00094	pathogenetic	NGS	2	c.1336C>T	p.Gln446*	stopgain SNV	Yes
26	TTF00029	TTSC00099	pathogenetic	NGS	2	c.4909_4910del	p.Lys1637fs	frameshift deletion	Yes
27	TTF00030	TTSC00103	pathogenetic	NGS, MLPA	2	c.1717-839_3610+239del (11kb)	-	large deletion	Yes
28	TTF00031	TTSC00119	no finding	NGS	-	-	-	-	-
29	TTF00032	TTSC00113	pathogenetic	NGS	2	c.4228_4229insCT	p.Ser1411*	frameshift insertion	No
30	TTF00033	TTSC00116	pathogenetic	NGS	2	c.599+1G>T	-	splicing	Yes
31	TTF00034	TTSC00121	likely pathogenetic	NGS	2	c.2086T>C	p.Cys696Arg	missense SNV	Yes
32	TTF00035	TTSC00124	pathogenetic	NGS	2	c.5238_5255del (18)	p.His1746_Arg1751del	in-frame deletion	Yes
33	TTF00036	TTSC00126	pathogenetic	NGS	1	c.1431_1434del	p.Glu478fs	frameshift deletion	-
34	TTF00038	TTSC00128	pathogenetic	NGS	2	c.4494-2A>G	-	splicing	-
35	TTF00039	TTSC00130	pathogenetic	NGS	2	c.5238_5255del (18)	p.His1746_Arg1751del	in-frame deletion	Yes

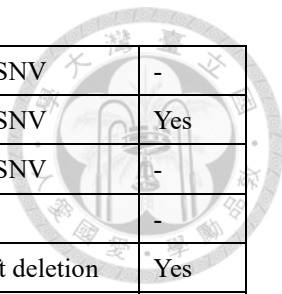


36	TTF00040	TTSC00134	likely pathogenetic	NGS	2	c.1793A>G	p.Tyr598Cys	missense SNV	Yes
37	TTF00041	TTSC00139	pathogenetic	NGS	1	c.1025del	p.Pro342fs	frameshift deletion	Yes
38	TTF00042	TTSC00144	likely pathogenetic	NGS, minigene	2	c.1947-3C>G	-	splicing	Yes
39	TTF00043	TTSC00146	pathogenetic	NGS	2	c.848+2del	-	splicing	Yes
40	TTF00044	TTSC00143	pathogenetic	NGS	2	c.4830G>A	p.Trp1610*	stopgain SNV	-
41	TTF00045	TTSC00153	pathogenetic	NGS	2	c.1372C>T	p.Arg458*	stopgain SNV	Yes
42	TTF00046	TTSC00157	pathogenetic	NGS	2	c.5162del	p.Met1721fs	frameshift deletion	-
43	TTF00047	TTSC00161	pathogenetic	NGS	2	c.1599+1G>A	NA	splicing	Yes
44	TTF00048	TTSC00164	pathogenetic	NGS	1	c.2332C>T	p.Gln778*	stopgain SNV	-
45	TTF00051	TTSC00160	likely pathogenetic	NGS, minigene	1	c.737+3A>G	-	splicing	No
46	TTF00052	TTSC00173	pathogenetic	NGS	2	c.2713C>T	p.Arg905Trp	missense SNV	Yes
47	TTF00053	TTSC00177	pathogenetic	NGS	2	c.2461A>T	p.Lys821*	stopgain SNV	Yes
48	TTF00054	TTSC00200	pathogenetic	NGS	1	c.649G>T	p.Glu217*	stopgain SNV	Yes
49	TTF00057	TTSC00181	pathogenetic	NGS, MLPA	2	<i>TSC2</i> ex26~ <i>PKDI</i>	-	large deletion	-
50	TTF00058	TTSC00184	pathogenetic	NGS	1	c.1798C>T	p.Gln600*	stopgain SNV	Yes
51	TTF00061	TTSC00193	pathogenetic	NGS	2	c.1117C>T	p.Gln373*	stopgain SNV	-
52	TTF00062	TTSC00194	pathogenetic	NGS	2	c.5035dup	p.Glu1679fs	frameshift insertion	Yes
53	TTF00063	TTSC00197	pathogenetic	NGS, MLPA	2	<i>TSC2</i> ~ ex15	-	large deletion	-

54	TTF00064	TTSC00201	likely pathogenetic	NGS, minigene	2	c.138+5G>T	-	splicing	No
55	TTF00065	TTSC00203	VUS	NGS minigene	2	c.1257+5G>C	-	splicing	-
56	TTF00066	TTSC00205	pathogenetic	NGS	2	c.1840-1G>A	-	splicing	-
57	TTF00067	TTSC00207	likely pathogenetic	NGS	2	c.2489T>A	p.Leu830His	missense SNV	No
58	TTF00068	TTSC00211	pathogenetic	NGS	2	c.127G>T	p.Glu43*	stopgain SNV	-
59	TTF00069	TTSC00212	pathogenetic	NGS	1	c.338T>A	p.Leu113*	stopgain SNV	-
60	TTF00070	TTSC00215	pathogenetic	NGS	2	c.2251C>T	p.Arg751*	stopgain SNV	-
61	TTF00071	TTSC00218	pathogenetic	NGS	2	c.4375C>T	p.Arg1459*	stopgain SNV	Yes
62	TTF00073	TTSC00220	pathogenetic	NGS	1	c.2507_2510del	p.Ser836fs	frameshift deletion	-
63	TTF00074	TTSC00223	pathogenetic	NGS	2	c.2353C>T	p.Gln785*	stopgain SNV	Yes
64	TTF00075	TTSC00225	no finding	NGS	-	-	-	-	-
65	TTF00076	TTSC00228	pathogenetic	NGS	2	c.94G>T	p.Glu32*	stopgain SNV	-
66	TTF00077	TTSC00236	pathogenetic	NGS	2	c.4494-1G>C	NA	splicing	Yes
67	TTF00078	TTSC00243	pathogenetic	NGS	2	c.1108C>T	p.Gln370*	stopgain SNV	Yes
68	TTF00079	TTSC00244	pathogenetic	NGS, MLPA	2	c.599+260_1600-517dup (9223 bp)	-	large duplication	-
69	TTF00080	TTSC00249	no finding	NGS	-	-	-	-	-
70	TTF00082	TTSC00255	pathogenetic	NGS	2	c.1513C>T	p.Arg505*	stopgain SNV	No
71	TTF00083	TTSC00259	pathogenetic	NGS	2	c.4562+2_4562+3del	NA	splicing	-
72	TTF00084	TTSC00265	pathogenetic	NGS	2	c.2498_2499del	p.I833fs	frameshift deletion	-

73	TTF00085	TTSC00270	VUS	NGS, minigene	2	c.5069-14_-6del	-	splicing	-
74	TTF00086	TTSC00271	pathogenetic	NGS	2	c.3558T>G	p.Tyr1186*	stopgain SNV	-
75	TTF00088	TTSC00273	pathogenetic	NGS	2	c.1837C>T	p.Gln613*	stopgain SNV	-
76	TTF00090	TTSC00275	pathogenetic	NGS, MLPA	2	<i>TSC2</i> ex26~ <i>PKD1</i>	-	large deletion	-
77	TTF00092	TTSC00276	pathogenetic	NGS	2	c.1864C>T	p.Arg622Trp	missenseSNV	Yes
78	TTF00093	TTSC00279	pathogenetic	NGS	2	c.1372C>T	p.Arg458*	stopgain SNV	Yes
79	TTF00094	TTSC00280	no finding	NGS	-	-	-	-	-
80	TTF00097	TTSC00286	likely pathogenetic	NGS	2	c.2450_2473del(24)	p.Asp817_Pro824del	in-frame deletion	-
81	TTF00098	TTSC00287	pathogenetic	NGS	2	c.5238_5255del (18)	p.His1746_Arg1751del	in-frame deletion	Yes
82	TTF00099	TTSC00291	no finding	NGS	-	-	-	-	-
83	TTF00100	TTSC00296	pathogenetic	NGS	2	c.246G>A	p.Trp82*	stopgain SNV	-
84	TTF00101	TTSC00299	pathogenetic	NGS	2	c.2363delT	p.Met788fs	frameshift deletion	-
85	TTF00102	TTSC00300	pathogenetic	NGS	2	c.707_710del(4)	p.Leu236fs	frameshift deletion	Yes
86	TTF00103	TTSC00307	pathogenetic	NGS	2	c.3412C>T	p.Arg1138*	stopgain SNV	Yes
87	TTF00104	TTSC00311	pathogenetic	NGS	2	c.5161-2A>G	-	splicing	-
88	TTF00106	TTSC00317	pathogenetic	NGS, MLPA	2	c.1716+1236del (<i>NTHL1</i> exon 4~ <i>TSC2</i> intron 5, 24918bp)	-	large deletion	Yes
89	TTF00107	TTSC00319	no finding	NGS	-	-	-	-	-
90	TTF00108	TTSC00327	pathogenetic	NGS	2	c.1429_1430delAG	p.Arg477fs	frameshift deletion	No

91	TTF00109	TTSC00324	no finding	NGS	-	-	-	-	-
92	TTF00110	TTSC00331	likely pathogenetic	NGS	2	c.3596T>C	p.Val1199Ala	missense SNV	Yes
93	TTF00112	TTSC00361	VUS	NGS	2	c.5135 C>A	p.Ala1712Asp	missense SNV	-
94	TTF00114	TTSC00363	pathogenetic	NGS	2	c.-175347_5419del (ch16:1922749 ~2138606 , 215857bp , <i>TSC2</i> ~ exon42)	-	large deletion	-
95	TTF00115	TTSC00368	pathogenetic	NGS	2	c.2090T>A	p.Leu697*	stopgain SNV	-
96	TTF00116	TTSC00365	pathogenetic	NGS	2	c.2777C>T	p.Gln743*	stopgain SNV	Yes
97	TTF00117	TTSC00370	pathogenetic	NGS	1	c.2074C>T	p.Arg692*	stopgain SNV	Yes
98	TTF00119	TTSC00375	pathogenetic	NGS	2	c.4941_4944del	p.Ser1647fs	frameshift deletion	Yes
99	TTF00122	TTSC00380	no finding	NGS	-	-	-	-	-
100	TTF00124	TTSC00358	pathogenetic	NGS	2	c.1491delC	p.Pro497fs	frameshift deletion	-
101	TTF00125	TTSC00386	pathogenetic	NGS	2	c.1943dup	p.Tyr648*	frameshift insertion	Yes
102	TTF00126	TTSC00389	pathogenetic	NGS	2	ex29-34 (5204bp)	-	large deletion	Yes
103	TTF00127	TTSC00392	pathogenetic	NGS	2	c.-9479_1716+145del <i>SLC9A3R2</i> 5'UTR~ <i>TSC2</i> intron15 (27165bp)	-	large deletion	-
104	TTF00128	TTSC00394	likely pathogenetic	NGS	1	c.569G>C	p.Arg190Pro	missense SNV	Yes
105	TTF00129	TTSC00397	pathogenetic	NGS	2	c.2764_2765del	p.Leu922fs	frameshift deletion	Yes
106	TTF00130	TTSC00410	likely pathogenetic	NGS	2	c.5150T>C	p.Leu1717Pro	missense SNV	Yes



107	TTF00131	TTSC00404	pathogenetic	NGS	1	c.1525C>T	p.Arg509*	stopgain SNV	-
108	TTF00132	TTSC00405	pathogenetic	NGS	2	c.1372C>T	p.Arg458*	stopgain SNV	Yes
109	TTF00133	TTSC00411	pathogenetic	NGS	2	c.274G>T	p.Glu92*	stopgain SNV	-
110	TTF00134	TTSC00412	pathogenetic	NGS	1	c.913-2A>G	-	splicing	-
111	TTF00135	TTSC00413	pathogenetic	NGS	2	c.5246_5259+13del	p.Arg1749fs	frameshift deletion	Yes
112	TTF00137	TTSC00417	VUS	NGS	2	c.5113G>C	p.Asp1705His	missense SNV	-
113	TTF00140	TTSC00434	pathogenetic	NGS	2	c.3598_3599insC	p.Arg1200ProfsTer34	frameshift insertion	-
114	TTF00141	TTSC00435	pathogenetic	NGS	2	c.5170C>T	p.Gln1724*	stopgain SNV	-
115	TTF00164	TTSC00440	pathogenetic	NGS	1	c.2074C>T	p.Arg692Ter	stopgain SNV	-
116	TTF00166	TTSC00442	no finding	NGS	-	-	-	-	-
117	TTF00168	TTSC00444	pathogenetic	NGS	1	c.2154dupG	p.Leu719AlafsTer15	frameshift insertion	-
118	TTF00169	TTSC00445	pathogenetic	NGS	2	c.2641delT	p.Phe881LeufsTer13	frameshift deletion	-
119	TTF00172	TTSC00449	pathogenetic	NGS	1	c.211-1G>T	-	splicing	-
120	TTF00175	TTSC00452	no finding	NGS	-	-	-	-	-
121	TTF00176	TTSC00453	pathogenetic	NGS	2	c.3310C>T	p.Gln1104Ter	stopgain SNV	-
122	TTF00177	TTSC00454	pathogenetic	NGS	1	c.2111_2112delAT	p.Tyr704Ter	frameshift deletion	-
123	TTF00178	TTSC00457	pathogenetic	NGS	2	c.2086T>C	p.Cys696Arg	missense SNV	No
124	TTF00179	TTSC00456	pathogenetic	NGS	1	c.2503-1G>A	-	splicing	-
125	TTF00181	TTSC00459	pathogenetic	NGS	2	c.4255_4258delCAGT	p.Ser1420Glyfs	frameshift deletion	-
126	TTF00182	TTSC00460	pathogenetic	NGS	2	c.1831C>T	p.Arg611Trp	missense SNV	-
127	TTF00183	TTSC00461	pathogenetic	NGS	1	c.1435G>T	p.E479X	stopgain SNV	-
128	TTF00184	TTSC00462	pathogenetic	NGS	1	c.2227C>T	p.Gln743Ter	stopgain SNV	-

129	TTF00185	TTSC00464	pathogenetic	NGS	2	c.1221C>G	p.Tyr407Ter	stopgain SNV	-
130	TTF00188	TTSC00467	pathogenetic	NGS	2	c.826_827delAT	p.Met276Valfs*61	frameshift deletion	-
131	TTF00189	TTSC00468	pathogenetic	NGS	2	c.4928A>G	p.Asn1643Ser	missense SNV	-
132	TTF00193	TTSC00472	pathogenetic	NGS	1	c.2319delC	p.Lys774Serfs	frameshift deletion	-
133	TTF00194	TTSC00473	likely pathogenetic	NGS	2	c.4957T>C	p.Ser1653Pro	missense SNV	-
134	TTF00195	TTSC00474	pathogenetic	NGS	2	c.139G>T	p.Glu47Ter	stopgain SNV	-
135	TTF00196	TTSC00475	pathogenetic	NGS	2	c.1232_1233insGG	p.Glu412GlyfsTer14	frameshift insertion	-
136	TTF00198	TTSC00477	pathogenetic	NGS	2	c.3085_3087delATG	p.Met1029del	in-frame deletion	Yes
137	TTF00199	TTSC00478	pathogenetic	NGS	1	c.2227C>T	p.Gln743Ter	stopgain SNV	-
138	TTF00201	TTSC00480	pathogenetic	NGS	2	c.5227_5244del (18)	p.Arg1743_Lys1748del	in-frame deletion	-
139	TTF00210	TTSC00490	pathogenetic	NGS	2	c.5160+2T>A	-	splicing	-
140	TTF00212	TTSC00493	pathogenetic	NGS	2	c.2098-1G>A	-	splicing	-
141	TTF00213	TTSC00494	pathogenetic	NGS	1	c.2283C>A	p.Tyr761*	stopgain SNV	-
142	TTF00214	TTSC00495	pathogenetic	NGS	1	-	-	translocation	-
143	TTF00219	TTSC00501	pathogenetic	NGS	2	Chr.16: 2,064,308-2,119,580 deletion (<i>NPW</i> , <i>SLC9A3R2</i> , <i>NTHL1</i> , <i>TSC2</i> ex1-16) 55.3kb	-	large deletion	-
144	TTF00221	TTSC00504	pathogenetic	NGS	2	c.C1783T	p.Q595X	stopgain SNV	-
145	TTF00222	TTSC00505	pathogenetic	NGS	1	c.891T>G	p.(Tyr297*)	stopgain SNV	No