

## Impronta genómica y endocrinología

L.A. Pérez Jurado

Unidad de Genética, Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universitat Pompeu Fabra. Barcelona.

La impronta genómica afecta a una minoría significativa de genes en los mamíferos (0,1-1%) los cuales se expresan exclusiva o preferentemente desde un solo alelo según sea el progenitor de origen. Significa que los genomas materno y paterno no son funcionalmente equivalentes en algunos *loci*. La impronta se asocia a modificaciones epigenéticas del ADN y alteraciones de la estructura cromatínica que ocurren durante la gametogénesis y el desarrollo embrionario, originando un estado funcionalmente haploide del genoma improntado. Se han identificado ya unos 75 genes improntados en los seres humanos, la mayoría en agrupamientos localizados en determinadas regiones cromosómicas. Estos genes tienen funciones relacionadas fundamentalmente con la regulación del crecimiento y desarrollo y con la conducta. Existen varias enfermedades por defectos de la impronta con afectación endocrinológica, como son los síndromes de Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi/Angelman, Russell-Silver, la osteodistrofia hereditaria de Albright y la diabetes neonatal transitoria. Es probable que otros cuadros con crecimiento intrauterino restringido se deban en parte a alteraciones de la impronta y/o otros mecanismos mutacionales no mendelianos, así como el desarrollo de numerosos cánceres. Finalmente, la posible asociación entre el uso de técnicas de reproducción asistida y un mayor riesgo de errores epigenéticos causantes de enfermedades es un tema actualmente candente.

### LA IMPRONTA GENÓMICA

La impronta genómica (*genomic imprinting*), también llamada gamética o genética, supone modificaciones específicas en la línea germinal que producen diferencias de expresión del material genético dependiendo de su procedencia, materna o paterna<sup>1</sup>. Las contribuciones materna y paterna no son funcionalmente idénticas al menos para varias regiones genómicas, por lo que se necesita contribución de ambos progenitores para que exista un desarrollo y función celular normal. La impronta genómica supone una de las excepciones a las reglas de Men-

del especialmente relevante en endocrinología, por su importancia fisiológica y por su implicación en diversas patologías. Con frecuencia se asocia a otros fenómenos genéticos de herencia no mendeliana como el mosaicismo y las disomías uniparentales. El entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares por los que se producen estos fenómenos es fundamental para poder deducir cuáles pueden ser las consecuencias clínicas sobre el organismo en las diferentes situaciones patológicas.

Hay muchas evidencias sobre la existencia de impronta a nivel del genoma, originalmente obtenidas mediante experimentos de transplante pronuclear en ratones (partenogénesis). Si se fusionan dos pronúcleos paternos (androgenéticos) producen una placenta normal con un embrión infradesarrollado (el equivalente a la mola hidatidiforme en patología humana), mientras que dos pronúcleos maternos (ginogenéticos) originan un embrión sobredesarrollado con una placenta y membranas aberrantes (teratoma en humanos). Por otro lado, la triploidía, 69 cromosomas con 3 juegos haploides, se manifiesta con un fenotipo muy diferente según que la contribución en exceso de 2 juegos haploides sea paterna (placenta quística, feto a término con malformaciones) o materna (placenta pequeña, retraso de crecimiento, aborto temprano). A nivel cromosómico, se ha demostrado que la impronta suele afectar a *racimos* o "*clusters*" de genes próximos que comparten regiones reguladoras comunes y se ha establecido un mapa tanto en el ratón como en el ser humano de regiones sometidas a impronta genómica (<http://www.genes.uchicago.edu/upd/upd.html>). Existen ya al menos 75 *loci* específicos con impronta demostrada (<http://www.geneimprint.com>), como por ejemplo IGF2, PEG1, SNRPN, IPW (expresión paterna), UBEA3, WT1 (expresión materna), o GNAS1 (diversos transcritos de expresión diferente).

Los posibles efectos de la impronta son: 1) *que* mutaciones con transmisión vertical puedan no manifestarse en generaciones con aparente falta de penetrancia; 2) la existencia de cuadros clínicos completamente diferentes

en casos de deleciones cromosómicas idénticas; 3) la aparición de fenotipo patológico en disomías uniparentales, y 4) el efecto diferencial de mutaciones somáticas en el desarrollo de cáncer. La variación depende en todos los casos del origen parental de la mutación o cromosoma disómico.

El mecanismo molecular de la impronta se asocia a una de las modificaciones epigenéticas más estudiadas del genoma, la metilación del ADN, que ocurre predominantemente en los dinucleótidos simétricos CpG<sup>2</sup>. Se desconocen todavía en detalle los mecanismos reguladores y se ignora si la metilación es primaria o secundaria. Sí se sabe que la demetilación del ADN y su acetilación permiten una mayor separación de los nucleosomas y una estructura cromatínica abierta que confiere competencia transcripcional. La metilación del ADN asociada a la impronta se asocia a una estructura cromatínica más compactada que inhibe la transcripción génica. Hay elementos reguladores situados sobre el ADN que controlan la expresión de genes localizados en *cis* incluso a largas distancias. Una metiltransferasa (Dnmt1) que prefiere un sustrato hemimetilado parece ser la encargada de mantener los patrones de metilación que se hayan establecido en células precursoras, perpetuando los programas predeterminados de expresión génica en las células descendientes. La prueba definitiva para confirmar que un gen está sometido a impronta es la demostración de que su expresión es monoalélica en al menos algún tejido. Parece tener relación a nivel molecular con el fenómeno de inactivación del cromosoma X.

El fenómeno de la impronta genómica tiene un ciclo vital característico: Ocurre en la línea germinal, durante la gametogénesis, y/o se modifica en fases embrionarias precoces<sup>2</sup>. Necesita que se borre la impronta primero para rehacerla después. Puede variar en el desarrollo con regulación témporo-espacial para ser en algunos casos específica de tejido o de momento de desarrollo. No obstante, los patrones de metilación genómica en células somáticas diferenciadas son generalmente estables y heredables. Por tanto, existen al menos dos momentos para la reprogramación en mamíferos, en células germinales y en embriones preimplantación, en los que se establece la totipotencia nuclear para el desarrollo normal.

La teoría más aceptada para explicar la aparición de la impronta en la evolución es la de la lucha o conflicto de sexos (teoría de Haig)<sup>3</sup>. La impronta es fundamental en mamíferos habiendo evolucionado en los últimos 125 millones de años, así como en algunas plantas, pero no parece existir en otros muchos animales. Esta distribución filogenética sugiere que la impronta haya aparecido en especies en las que puede existir más de un padre para una concepción simultánea en una madre. La impronta se habría desarrollado como un mecanismo para dirimir una lucha de poderes a nivel de expresión entre los genes paternos, promotores de crecimiento y que intentan que su

descendencia sea favorecida respecto a la de otros padres, y los genes maternos que pretenden ser equitativos entre toda la prole y actúan como represores de crecimiento.

Un sistema endocrino controlado en gran medida por fenómenos de impronta es el hipotálamo, que integra procesos fisiológicos necesarios para la supervivencia y la reproducción. Varios genes sometidos a expresión monoalélica exclusivamente paterna regulada por la impronta son fundamentales para el desarrollo de los centros hipotalámicos como PEG3, MEST/PEG1 y NECDIN<sup>4</sup>.

## MOSAICISMO Y DISOMÍAS UNIPARENTALES

El mosaicismo se define como la presencia en un individuo o tejido de al menos dos líneas celulares que difieren en su genotipo (o cariotipo), derivando ambas de un cigoto único. Se produce bien por una mutación poscigótica, o bien por una corrección de una mutación en un cigoto. Los efectos del mosaicismo somático son la presencia de un fenotipo más moderado, la distribución asimétrica y en parches de las manifestaciones y la posible discordancia en gemelos monocigóticos. El mosaicismo es la base molecular del cáncer y del fenómeno de inactivación del X en mujeres.

La disomía uniparental supone la presencia de una pareja de cromosomas homólogos ambos procedentes del mismo progenitor en un individuo o línea celular disómica. Es probable que sea un fenómeno relativamente frecuente. Se denomina isodisomía cuando es el mismo cromosoma duplicado y heterodisomía si se trata de los dos cromosomas homólogos pero diferentes de un mismo progenitor. El mecanismo de producción de la disomía uniparental deriva generalmente de una no disyunción en meiosis, seguida de una corrección que puede ser necesaria para la viabilidad del cigoto o de las células somáticas, y que se produce de alguno de los siguientes modos: pérdida cromosómica subsiguiente o complementación gamética (dan lugar a heterodisomía), duplicación cromosómica posterior (da lugar a isodisomía). La disomía uniparental puede ser regional cuando afecta sólo a parte del cromosoma. En estos casos el mecanismo de producción más probable es la recombinación mitótica.

Los posibles efectos de la disomía uniparental son la aparición de enfermedades recesivas siendo un único padre el portador (isodisomías), o mujeres homocigotas para enfermedades recesivas ligadas al X, la existencia de transmisión varón a varón de enfermedades ligadas al X, la aparición de anomalías del desarrollo si hay regiones con impronta gamética.

Un tipo de mosaicismo relativamente frecuente es el mosaicismo confinado a la placenta (MCP). Se puede producir por cualquiera de los mismos mecanismos que originan mosaicismo: por la aparición de una mutación de novo en células placentarias o por el rescate (normalmen-

te en células fetales y no placentarias) de una mutación existente en el cigoto. Este último mecanismo, sobre todo en relación con anomalías cromosómicas, es probablemente bastante frecuente porque el desarrollo placentario no requiere una información genética tan precisa y bien orquestada como el desarrollo fetal. Por ello, anomalías genéticas letales para el feto (p. ej., la mayoría de las trisomías cromosómicas) pueden ser toleradas por la placenta. La supervivencia de esa gestación depende del rescate del cigoto trisómico mediante la pérdida de un cromosoma en las células totipotenciales que van a dar origen al feto. Las células placentarias pueden seguir siendo trisómicas (MCP) mientras que las únicas células fetales que sobrevivirán y proliferarán por selección son las rescatadas y disómicas. Como consecuencia del rescate de la trisomía, existe una probabilidad de 1:3 de que los dos cromosomas que se queden procedan del mismo progenitor causando una disomía uniparental asociada a MCP.

### **PATOLOGÍAS ENDOCRINAS CON MUTACIONES QUE AFECTAN A LA IMPRONTA GAMÉTICA**

#### **Síndromes de Angelman (SA) y Prader-Willi (SPW)**

Estos dos cuadros fueron las primeras patologías en que se documentó la existencia de impronta genómica. La afectación en el SA es fundamentalmente neurológica con retraso mental importante y ausencia de lenguaje, hipotonía, convulsiones, ataxia y brotes de risa inapropiados, así como retraso de crecimiento y microcefalia. El SPW se presenta con discreto retraso de crecimiento intrauterino e hipotonía neonatal importante, para más adelante desarrollar un cuadro de predominante afectación hipotalámica con retraso de crecimiento, hipogonadismo, apetito insaciable llevando a obesidad importante, retraso mental leve o moderado con otros trastornos de conducta. Se trata pues de dos enfermedades muy diferentes causadas por deleciones del mismo tamaño en la misma región cromosómica. Posteriormente se descubrió que el origen parental de las deleciones era diferente en cada caso: paterno en el SPW, materno en SA. Eso quiere decir que en esa región cromosómica existen genes que sólo se expresan desde un cromosoma (materno o paterno) en condiciones normales. La ausencia de una copia por deleción, disomía uniparental, defectos de la impronta o mutaciones puntuales en el caso del SA (ver tabla 1), condiciona el fenotipo de una u otra enfermedad dependiendo del origen del cromosoma alterado (5).

#### **Crecimiento intrauterino restringido y síndrome de Russell-Silver**

El crecimiento intrauterino restringido (C.I.R.) es una causa muy importante de morbilidad y mortalidad perinatal (10%) que además se asocia a un riesgo de retraso de crecimiento postnatal. Existen numerosas causas ambientales (nutrición maternal, tóxicos, infecciones), pero

**TABLA 1. Causas moleculares conocidas de los síndromes de Prader Willi (SPW) y Angelman (SA)**

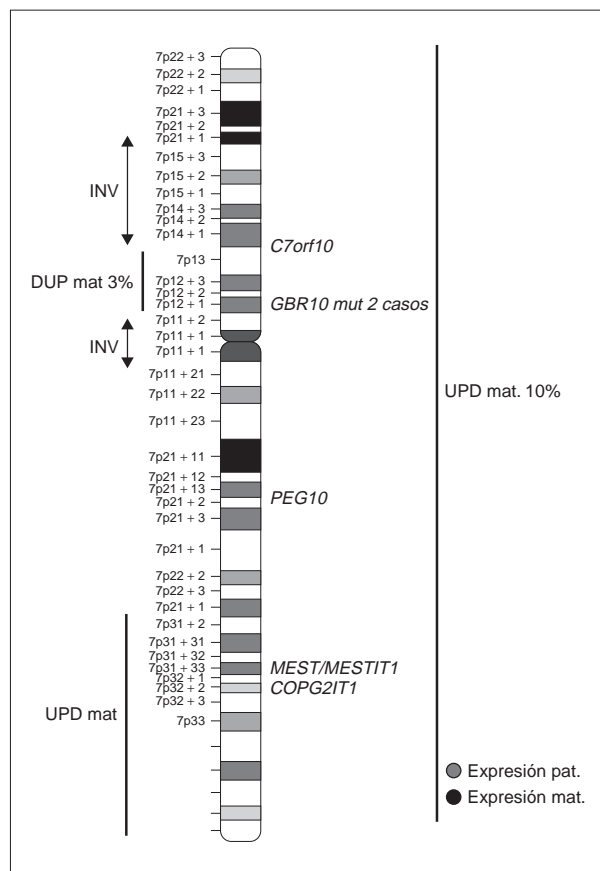
	<b>SPW</b>	<b>SA</b>
Deleciones	75% pat	75% mat
Disomía uniparental	20% mat	3% pat
Mutaciones puntuales (UBE3A)	—	15% mat
Errores de impronta	2%	5%

aproximadamente el 50% se deben a causas genéticas. Dejando a un lado los casos de C.I.R. asociados a cuadros sindrómicos conocidos y otras enfermedades genéticas, un porcentaje significativo de los considerados idiopáticos, se deben realmente a alteraciones genéticas de las denominadas no mendelianas: mosaicismo genético, impronta genómica y disomías uniparentales.

El síndrome de Russell-Silver (SRS) es un retraso de crecimiento primordial que se presenta con retraso de crecimiento intrauterino y problemas de crecimiento postnatal y puede asociar asimetrías (en la cara o extremidades), manchas cutáneas y rasgos dismórficos leves. Normalmente el desarrollo psicomotor es normal y no hay otros problemas médicos importantes. Aunque la causa molecular es heterogénea y todavía desconocida en la mayoría de los casos, se han detectado varias alteraciones en el cromosoma 7 que pueden llevar al diagnóstico en un 15-20% de los pacientes con SRS (fig. 1). Estos mecanismos incluyen la generación de disomías uniparentales totales o regionales en 7q (7-10%), otras alteraciones cromosómicas como duplicaciones e inversiones en distintos intervalos de 7p, mutaciones puntuales en el gen GBR10, y la posibilidad de que exista un MCP específicamente para trisomía 7 que pudiera incluso no haber sido detectado. En estudios a mayor escala, la disomía uniparental materna del cromosoma 7 no parece ser una causa frecuente de retraso de crecimiento postnatal aislado ni de retraso de crecimiento prenatal si no se asocia a rasgos de SRS. Sin embargo, sí se han detectado disomías uniparentales de otros cromosomas (2, 14 y 20 entre otros) como responsables de cuadros con retraso de crecimiento intrauterino asociados a problemas adicionales.

#### **Síndrome de Beckwith-Wiedemann**

El síndrome de Beckwith-Wiedemann syndrome (SBW) se caracteriza por sobrecrecimiento somático de origen prenatal y susceptibilidad a tumores embrionarios pediátricos. Se asocia también con alteraciones genéticas o epigenéticas en un racimo de genes normalmente improntados, localizados en la banda cromosómica 11p15.7. Esta región está organizada en dos dominios



**Figura 1.** Bases moleculares descritas en pacientes con síndrome de Russell-Silver. INV, inversiones; UPD, disomía uniparental; DUP, duplicación intracromosómica. En el centro se sitúan los genes imprintados conocidos en el cromosoma 7; en rojo de expresión desde el cromosoma materno y en azul desde el cromosoma paterno.

principales en los que parece haber dos centros de control de la impronta separados. Diversos tipos de mutaciones cromosómicas y génicas pueden alterar la regulación epigenética de la región causando SBW (tabla 2).

Más de la mitad de los pacientes con SBW presentan una expresión bialélica en lugar de monoalélica del gen que codifica el factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF2) lo que condiciona el hipercrecimiento y posiblemente el riesgo tumoral. Otros pacientes presentan una mutación epigenética que resulta en la pérdida de otro transcrito, KCNQ1OT1. Cada uno de estos genes está situado en uno de los dominios imprintados que parecen estar sujetos a una desregulación durante el desarrollo en los pacientes con SBW (tabla 2), y parece haber contribuido a nuestro entendimiento sobre los mecanismos de control del crecimiento, la oncogénesis y la impronta genómica.

### Pseudohipoparatiroidismo

El pseudohipoparatiroidismo (PHP) es una enfermedad heterogénea caracterizada por resistencia a la paratohormona (PTH) y que se clasifica en los tipos Ia, Ib, Ic, y II, según el mecanismo patogénico y el fenotipo. Los pacientes con PHP-Ia tienen un déficit de la proteína  $Gs\alpha$ , resistencia a la PTH y fenotipo de osteodistrofia hereditaria de Albright. Por el contrario, el pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP), un trastorno con fenotipo de osteodistrofia hereditaria de Albright sin resistencia hormonal. Se han encontrado mutaciones en el gen que codifica la proteína  $Gs\alpha$  (GNAS1) tanto en PHP-Ia como en PP. El hecho de que una misma mutación en la misma familia puede causar ambos fenotipos PHP-Ia o PPHP, según el afectado haya heredado en el alelo materno o en el paterno, respectivamente, indica que GNAS1 es un gen imprintado<sup>8</sup>. Curiosamente, GNAS1 presenta una estructura génica bastante compleja con diversas unidades de transcripción en cada cadena del ADN cada una de ellas con una variable expresión mono o bialélica. Los pacientes con PHP-Ib tienen resistencia a la PTH sin fenotipo de osteodistrofia. Recientemente se ha encontrado que la pérdida de metilación en una región metilada diferencialmente en el exón A/B de GNAS1 es responsable de todos los casos esporádicos de PHP-Ib<sup>9</sup>.

**TABLA 2. Hallazgos genéticos y su frecuencia en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann**

Base molecular	Disomía uniparental paterna (mosaico)	Duplicación paterna	Translocación materna telomérica o en CDKN1C	Mutaciones puntuales CDKN1C maternas	Defectos impronta BWSC1	Defectos impronta BWSC2
Expresión IGF2	Aumentada	Aumentada	Aumentada	Normal	Aumentada	Aumentada
H19	Reducida	Normal	Normal	Normal	Reducida	Normal
CDKN1C	Reducida	Normal	Normal	Reducida	Normal	Reducida
Frecuencia	20% de los casos esporádicos	2% del total	2% del total	40% de los casos familiares 5% de los casos esporádicos	5-10% de los casos esporádicos	40% de los casos esporádicos

## Diabetes neonatal transitoria

La diabetes neonatal transitoria es una forma infrecuente de diabetes mellitus que se presenta en el periodo neonatal en recién nacidos normalmente con bajo peso para la edad gestacional. Suele remitir hacia los tres meses de vida o incluso antes, pero estos pacientes tienen gran riesgo de desarrollar de nuevo diabetes más adelante. Se ha encontrado asociada a disomía uniparental paternal del cromosoma 6, a duplicaciones intracromosómicas en el cromosoma de origen paterno con una región crítica localizada en 6q24 y a defectos de la metilación en una isla CpG de 6q24. Hay por tanto evidencia de que se debe a la sobreexpresión de algún gen de esta región que está improntado y se expresa exclusivamente desde el cromosoma paterno. Existen dos genes identificados en la región, de expresión paterna y ambos activados en la isla CpG cuya metilación es anormal en algunos pacientes, por lo que son candidatos excelentes para contribuir al fenotipo: ZAC codifica una proteína de dedos de cinc asociada con apoptosis y detención del ciclo celular, y HYMAI codifica una proteína de función desconocida pero se ha demostrado su estado improntado en la mola hidatidiforme<sup>10</sup>.

## IMPRONTA DE LA FUNCIÓN COGNITIVA EN EL SÍNDROME DE TURNER

Se ha demostrado que las mujeres con síndrome de Turner (45,X0) si el cromosoma X que retienen es de procedencia paterna presentan mejor adaptación social y mayores habilidades verbales en comparación con mujeres con síndrome de Turner (45,X0) y cromosoma X de procedencia materna. Estos resultados sugieren que exista un locus en el cromosoma X también improntado que no se expresa desde el cromosoma X materno y actúe de alguna manera en la función cognitiva social. Mediante estudios en pacientes con síndrome de Turner y deleciones de Xp, este locus se ha localizado en Xq o próximo al centrómero en Xp y debería no estar sometido a la inactivación del X. Si se prueba definitivamente la existencia de un gen con esas características y que sólo se expresa desde el cromosoma X procedente del padre, ello explicaría al menos en parte por qué los varones en general cuyo único cromosoma X es materno, son mucho más vulnerables que las mujeres para trastornos del desarrollo que afectan al lenguaje y al comportamiento social, como el autismo.

## REPRODUCCIÓN ASISTIDA, ANOMALÍAS DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO Y DEFECTOS DE IMPRONTA

Aunque no se puede poner en duda el éxito de las técnicas de reproducción asistida (TRA) para conseguir la concepción en parejas con problemas de fertilidad, existen cada vez más evidencias que indican que estas técnicas suponen un riesgo significativamente elevado con

respecto a las concepciones naturales de presentación anomalías fetales, que incluyen retraso de crecimiento y desarrollo, malformaciones, así como alteraciones cromosómicas y afectación de la impronta genómica. Hay diversas causas posibles para explicar el riesgo aumentado de defectos fetales tras TRA.

En primer lugar, las propias causas de la infertilidad o subfertilidad en los padres pueden ya asociarse a un mayor riesgo de anomalías genéticas o cromosómicas transmisibles.

En segundo lugar, los embarazos generados por TRA difieren de los embarazos espontáneos en que los gametos y embriones se cultivan *in vitro* con medios de cultivo artificiales, se transfiere a la cavidad uterina más de un embrión, y el momento de dicha transferencia no es igual al que ocurre en condiciones normales. Es pues posible que la manipulación del embrión modifique la concurrente reprogramación epigenética de la expresión génica, lo que podría alterar la impronta e inducir cambios en el crecimiento y desarrollo fetal. Hay diversas observaciones recientes que sugieren una asociación entre TRA y errores epigenéticos, obtenidas desde registros de niños con síndromes de Beckwith-Wiedemann, Angelman y retinoblastoma. Aunque todavía no se han realizado estudios epidemiológicos controlados, los datos indican un riesgo de cuatro a seis veces superior para cada una de las patologías citadas en las concepciones realizadas por TRA.

En tercer lugar, el ambiente materno, con la hiperestimulación ovárica al inicio de la gestación, podría alterar la respuesta materna a las fases tempranas de la invasión trofoblástica. Hay datos que sugieren que el peso de las placentas y el cociente peso placentario / peso fetal están elevados en estos embarazos similar a lo que ocurre en los casos de malnutrición materna en fases precoces del embarazo.

Se necesita avanzar más en el conocimiento de los mecanismos epigenéticos asociados con las etapas precoces de la embriogénesis, específicamente la metilación y la modificación de la cromatina como coordinadores de la expresión de genes improntados estrechamente ligados, así como de los factores externos que pueden alterar esa coordinación y sus consecuencias. La preocupación sobre los efectos potencialmente nocivos incluso transgeneracionales con algunos procedimientos médicos a través de modificaciones de la impronta está justificada y hay una llamada de atención internacional con propuestas de realización de estudios para evaluar esa posibilidad. Por ahora, se debe ser cauto, manteniendo el debate y potenciando la investigación sobre las tecnologías de reproducción asistida y la clonación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reik W, Walter J. Genomic imprinting, parental influence on the genome. *Nature Rev Genet* 2001;2:21-32.

2. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-93.
3. Moore T, Haig D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends Genet* 1991;7:45-9.
4. Michaud JL. The developmental program of the hypothalamus and its disorders. *Clin Genet* 2001;60:255-63.
5. Vogels A, Fryns JP. The Prader-Willi syndrome and the Angelman syndrome. *Genet Couns* 2002;13:385-96.
6. Monk D, Bentley L, Hitchins M et al. Chromosome 7p disruptions in Silver Russell syndrome: delineating an imprinted candidate gene region. *Hum Genet* 2002;111:376-87.
7. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* 2003;12:R61-R68.
8. Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *Endocr Rev* 2001;22:675-705.
9. Bastepe M, Fröhlich LF, Hendy GN et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest* 2003;112:1255-63.
10. Temple IK, Shield JP. Transient neonatal diabetes, a disorder of imprinting. *J Med Genet* 2002;39:872-5.
11. Skuse DH, James RS, Bishop DVM et al. Evidence from Turner's syndrome of an imprinted locus affecting cognitive function. *Nature* 1997;387:705-8.
12. Niemitz EL, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet* 2004;74: 599-609.