

Centro de Estudos do Genoma Humano: Seis Anos de Experiência no Diagnóstico Molecular da Síndrome de Rett

Centro de Estudos do Genoma Humano: Our Six-Year Experience on the Molecular Diagnosis of Rett Syndrome

Alessandra Splendore¹, Kátia Maria da Rocha², Vanessa Naomi Van Opstal Takahashi³, Mayana Zatz⁴, Maria Rita Passos-Bueno⁵

RESUMO

Objetivo. A síndrome de Rett (RTT), causada por mutações no gene *MECP2*, é uma encefalopatia grave e a segunda causa mais frequente de retardamento mental em meninas. O objetivo deste trabalho é avaliar a experiência do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) em seis anos de diagnóstico molecular da RTT. **Método.** Levantamento retrospectivo dos prontuários dos pacientes atendidos no CEGH com suspeita clínica de RTT entre 2005 e 2010. **Resultados.** Dois métodos de análise foram empregados: sequenciamento direto dos exons 3 e 4 do gene *MECP2* ou triagem de mutações nos exons 2, 3 e 4 seguida de sequenciamento das amostras que tivessem alguma alteração detectada na triagem. Dos 139 probandos testados, encontramos a mutação patogênica em 59 (42,4%). Desses, oito nunca haviam sido descritas. Ambos os métodos foram igualmente eficazes. **Conclusões.** Dada a variabilidade clínica de RTT, nossa taxa de detecção é compatível com a literatura para uma amostra contendo casos típicos e atípicos e para o método empregado. Concluímos que o sequenciamento direto é um método eficaz e que traz a vantagem adicional de ser capaz de detectar mutações novas. Para melhorar nossa taxa de detecção, passaremos a oferecer também o teste para grandes deleções em *MECP2*.

Unitermos. Síndrome de Rett, Gene *MECP2*, Mutação, Técnicas de Diagnóstico Molecular.

Citação. Splendore A, Rocha KM, Takahashi VNVO, Zatz M, Passos-Bueno MR. Centro de Estudos do Genoma Humano: Seis Anos de Experiência no Diagnóstico Molecular da Síndrome de Rett.

Trabalho realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil. Apoio financeiro: FAPESP/CEPID, CNPq.

1. Bióloga, Doutora em Genética, Centro de Estudos do Genoma Humano, USP, São Paulo-SP, Brasil.
2. Bióloga, Doutora em Bioquímica, Centro de Estudos do Genoma Humano, USP, São Paulo-SP, Brasil.
3. Bióloga, Mestre em Microbiologia, Centro de Estudos do Genoma Humano, USP, São Paulo-SP, Brasil.
4. Bióloga, Doutora, Coordenadora Geral do CEGH, Professora Titular de Genética, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, USP, São Paulo-SP, Brasil.
5. Bióloga, Doutora, Coordenadora de Transferência de Tecnologia do CEGH, Professora Titular de Genética, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, USP, São Paulo-SP, Brasil.

ABSTRACT

Objective. Rett syndrome (RTT) is a severe neurodevelopmental disorder caused by *MECP2* mutations. It is also the second most common cause of mental retardation in girls. In this work, we evaluated our six-year experience with the molecular diagnosis of RTT at the Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH). **Method.** We performed retrospective chart reviews of patients referred to the CEGH for molecular analysis of *MECP2* mutations between 2005 and 2010. **Results.** The molecular analysis was conducted in one of two ways: a) direct sequencing of *MECP2* exons 3 and 4 or b) screening of exons 2, 3, and 4 followed by sequencing of samples that had indication of a sequence alteration. Of 139 probands tested, we identified the pathogenic mutation in 59 (42.4%). Eight of these mutations were previously unpublished. Both testing methods were equally effective. **Conclusion.** Our mutation detection rate is compatible with literature data for a sample composed of typical and atypical RTT patients. Direct sequencing of exons 3 and 4 is an effective testing strategy that not only detects the most common mutations, but can also identify novel alterations. To further improve our mutation detection rate, we will also offer testing for large deletions on *MECP2*.

Keywords. Rett Syndrome, Gene *MECP2*, Mutation, Molecular Diagnosis Techniques.

Citation. Splendore A, Rocha KM, Takahashi VNVO, Zatz M, Passos-Bueno MR. Centro de Estudos do Genoma Humano: Our Six-Year Experience on the Molecular Diagnosis of Rett Syndrome.

Endereço para correspondência:

Maria Rita Passos Bueno
Centro de Estudos do Genoma Humano
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva
Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo
CEP 05508-900, São Paulo-SP, Brasil.
Tel.: 11-30919910
E-mail: passos@ib.usp.br

Original

Recebido em: 18/05/11

Aceito em: 04/10/11

Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

A síndrome de Rett (RTT, MIM #312750) é uma encefalopatia progressiva que afeta quase exclusivamente meninas. Estima-se que a prevalência da RTT aos 15 anos seja 1:8.500, sendo assim a segunda causa mais frequente de retardamento mental em meninas, depois da síndrome de Down¹.

O quadro clínico da RTT é caracterizado por um desenvolvimento relativamente normal até os 6-18 meses, seguido por uma deterioração de funções motoras e cognitivas. Essa deterioração resulta em perda da fala, aquisição de movimentos estereotipados das mãos, ataxia, microcefalia e retardamento mental. As meninas afetadas também podem apresentar convulsões². O quadro clínico é variável, o que pode complicar o diagnóstico. Existem critérios para o diagnóstico da forma clássica da RTT e também das chamadas variantes ou formas atípicas, onde nem todos os sinais clínicos estão presentes. Os casos atípicos podem ser mais graves ou mais leves do que a forma clássica. Por exemplo, existe uma variante onde a criança apresenta convulsões desde o nascimento, e outra onde há preservação da fala³.

Em 1999, descobriu-se que mutações no gene *MECP2*, localizado no cromossomo X, eram a causa molecular da RTT⁴. Após essa descoberta, foram realizados estudos de triagem de mutações em *MECP2* em várias coortes de meninas com RTT clássica e atípica. Cerca de 80% das meninas com RTT clássica apresentam uma mutação patogênica em *MECP2*. Por outro lado, apenas 40% dos casos atípicos apresentaram mutação no mesmo gene⁵⁻⁷. Deve-se notar que mutações em *MECP2* também foram encontradas em meninas com retardamento leve^{8,9}, com quadro clínico sugestivo de síndrome de Angelman^{10,11} (MIM #105830) e em meninos com encefalopatia grave¹².

O gene *MECP2* tem quatro exons, mas apenas os exons 1, 3 e 4 codificam a proteína MECP2B, que é expressa predominantemente no cérebro¹³. A maior parte das mutações patogênicas descritas até hoje está localizada nos exons 3 e 4, e são trocas de aminoácidos ou pequenas deleções, inserções ou duplicações que alteram a fase de leitura do RNA mensageiro, resultando em uma proteína aberrante¹⁴. Cerca de 5-10% das mutações patogênicas descritas são grandes deleções que abrangem

exons inteiros do gene *MECP2*^{15,16}. Essas deleções não são detectadas pelos métodos tradicionais de triagem de mutações em *MECP2*, como, por exemplo, dHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) ou mesmo por sequenciamento. Assim, identificar grandes deleções exige o emprego de métodos sensíveis à dosagem gênica, como MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) ou PCR quantitativo.

A identificação de mutações no gene *MECP2* pode auxiliar no processo de diagnóstico, inclusive nos casos atípicos. O estabelecimento do diagnóstico também tem um impacto importante no aconselhamento genético, uma vez que a maioria dos casos é resultante de mutação nova e, portanto, o risco de novos filhos afetados para um casal que teve uma criança com RTT pode ser baixo, semelhante ao da população geral. Os laboratórios que oferecem o teste diagnóstico para RTT podem empregar diferentes técnicas, cada uma com suas vantagens e limitações. O objetivo deste trabalho é avaliar a experiência do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) em seis anos de diagnóstico molecular da RTT. Comparamos nossos dados com a literatura publicada e avaliamos a necessidade da introdução de novas técnicas de teste para melhorar o serviço oferecido.

MÉTODO

Amostra

Os pacientes testados foram encaminhados ao CEGH entre 2005 e 2010 para exclusão ou confirmação de suspeita clínica de RTT. Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP (processo no 028/2004).

Procedimento

De 2005 a 2008, o método de análise consistiu em uma triagem inicial por dHPLC (WAVE, Transgenomic) seguida de sequenciamento apenas das amostras com padrão aberrante. A partir de 2009, passamos a realizar o sequenciamento direto sem uma etapa anterior de triagem.

Para realizar triagem de mutações por dHPLC, amplificamos por PCR cinco fragmentos do gene *MECP2*, correspondentes ao exon 2 (um fragmento), exon 3 (um fragmento) e exon 4 (três fragmentos). Os fragmentos amplificados foram submetidos à análise por cromatogra-

fia no aparelho WAVE e a curva de eluição foi analisada em comparação a um controle sem mutação no fragmento analisado. Para aquelas amostras que apresentaram uma curva de eluição diferente do controle foi realizado o sequenciamento do fragmento em questão.

Para o teste de sequenciamento direto, foram amplificados por PCR quatro fragmentos do gene *MECP2*, que cobrem a maior parte de sua sequência codificadora: exon 3 (um fragmento) e exon 4 (três fragmentos). Os sequenciamentos foram realizados em sequenciadores automáticos modelo MegaBACE 1000 (GE Healthcare) ou ABI3730 (Life Technologies). A sequência resultante foi comparada com a sequência padrão do gene *MECP2* (NM_004992). Toda alteração encontrada foi checada no banco de dados RettBASE¹⁷ para saber se era polimórfica, patogênica ou ainda não descrita. No caso de mutações ainda não descritas, sua patogenicidade foi determinada com base na consequência predita na proteína e, em alguns casos, testaram-se os pais para determinar se a mutação era nova ou herdada.

RESULTADOS

Entre 2005 e 2010, foram encaminhados para o nosso serviço 138 probandos do sexo feminino com suspeita clínica de RTT. Esse número não inclui familiares de probandos com mutação identificada que também foram testados.

Entre 2005 e 2008, 85 probandos foram triados por dHPLC, sendo que 45 tiveram alguma alteração detectada. Como houve casos de mais de uma alteração detectada em um mesmo probando, no total 55 fragmentos de DNA foram submetidos ao sequenciamento. Desses, 23 (41,8%) foram polimorfismos e 32 (58,2%) foram mutações patogênicas (Figura 1). Com isso, identificamos a mutação patogênica em 37,6% dos probandos testados (Tabela 1). Nenhuma mutação patogênica foi identificada no exon 2. Nove por cento das mutações (3/32) foram localizadas no exon 3, enquanto as restantes foram localizadas no exon 4 (Figura 2).

A partir de 2009, mudamos o método de análise e passamos a realizar o sequenciamento direto dos exons 3 e 4 sem uma etapa prévia de triagem. Nos anos de 2009 e 2010, foram testados 53 probandos, sendo que identificamos uma mutação patogênica em 50,9% (Tabela 1).

Dezoito por cento das mutações (5/27) foram localizadas no exon 3, enquanto as restantes foram localizadas no exon 4 (Figura 2).

Considerando nossa amostra total, as mutações patogênicas detectadas foram trocas de nucleotídeos (48/59 ou 81,4%) ou pequenas deleções, inserções ou duplicações que tiram de fase a leitura da proteína (11/59 ou 18,6%). Na nossa amostra, as cinco mutações no gene *MECP2* mais frequentes segundo a literatura representaram 55% do total de mutações identificadas (Figura 3). As outras mutações são, em sua maioria, de ocorrência única e oito delas não estão descritas no banco de dados RettBASE¹⁷. Nos quatro casos de mutação ainda não descrita em que se testaram os pais da paciente, verificamos tratar-se de mutação nova. A relação das mutações inéditas está apresentada na Tabela 2.

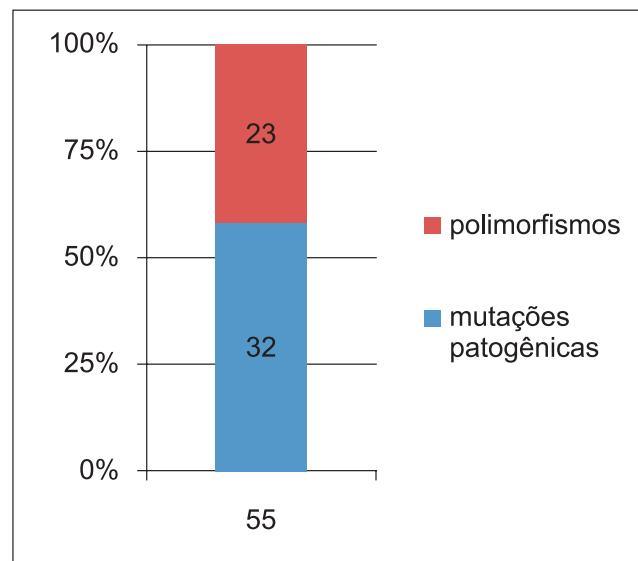


Figura 1. Proporção das alterações detectadas por dHPLC correspondente a polimorfismos benignos e mutações patogênicas.

Tabela 1

Número de probandos testados e mutações encontradas

Período	Pacientes testados	Método	Pacientes com mutação identificada
2005-2008	85	DHPLC + Sequenciamento	32 (37,6%)
2009-2010	53	Sequenciamento dos exons 3 e 4	27 (50,9%)
Total	138		59 (42,7%)

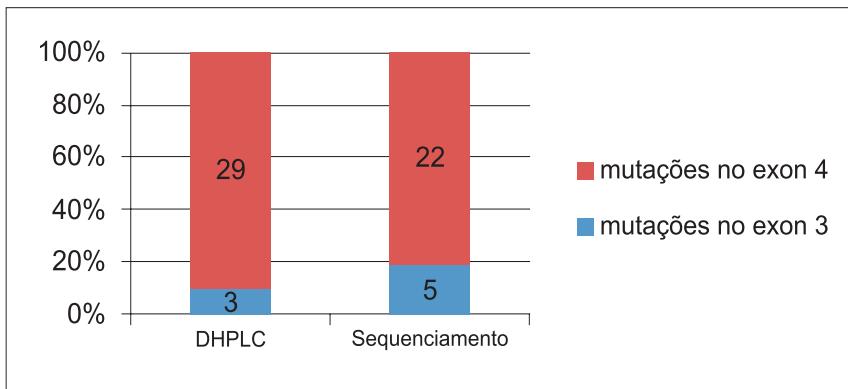


Figura 2. Proporção de mutações patogênicas localizadas nos exons 3 e 4 do gene *MECP2*.

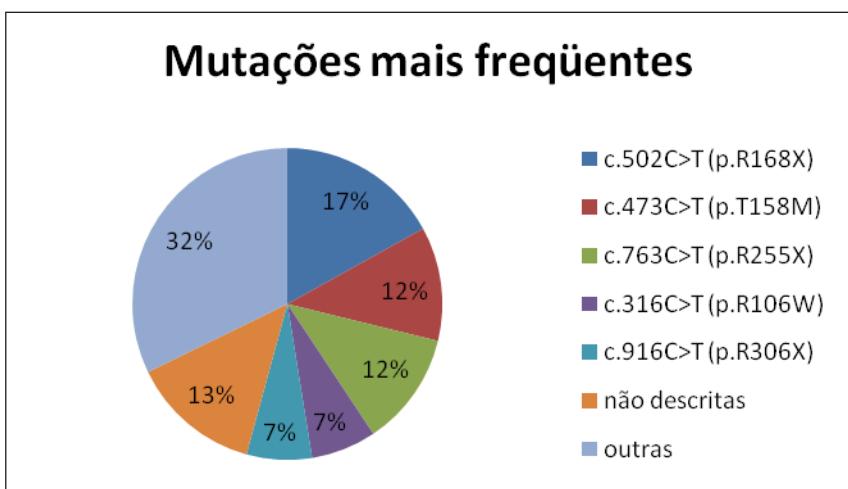


Figura 3. Mutações recorrentes, raras e novas na amostra do CEGH.

DISCUSSÃO

Não houve diferença significante na taxa de detecção de mutação quando comparamos a triagem por dHPLC (32/86) com o sequenciamento direto (27/53) (Teste T, $p=0,20$, indicando diferença não significativa). O uso de métodos de triagem como o dHPLC são vantajosos quando o custo da triagem é menor do que o custo de se realizar o sequenciamento direto. A desvantagem desse método de triagem é sua incapacidade de distinguir entre uma alteração patogênica na sequência do DNA de uma alteração recorrente na população sem consequência clínica (polimorfismo benigno). Como polimorfismos no gene *MECP2* são identificados com uma frequência relativamente alta (cerca de 25% ou 34/138 na nossa amostra), isso gera um número maior de reações de sequenciamento das alterações identificadas na triagem por dHPLC do que apenas as reações que seriam necessárias

para identificação das mutações patogênicas.

Graças ao desenvolvimento de sequenciadores de larga escala, o tempo e custo por reação de sequenciamento diminuíram nos últimos anos. Na nossa amostra, mais de 40% dos pacientes tem uma mutação patogênica identificada no gene *MECP2*, uma proporção grande o suficiente para justificar o sequenciamento direto sem a realização de uma etapa anterior de triagem.

O sequenciamento direto também tem vantagens sobre os métodos que realizam a triagem apenas das mutações mais frequentes¹⁸. Na nossa amostra, as cinco alterações mais frequentes corresponderam a 55% do total de mutações patogênicas identificadas. Mesmo se considerarmos as 10 mutações mais frequentes, elas corresponderiam a 62,7% (37/59) das mutações patogênicas identificadas. Isso significa que 22 dos nossos probandos com mutação identificada não seriam diagnosticados por um método de triagem de mutações específicas. Assim, o sequenciamento direto traz a possibilidade de identificação de mutações raras e novas. Na nossa amostra, foram identificadas oito mutações patogênicas ainda não descritas, o que corresponde a 13% de todas as mutações patogênicas identificadas.

Apesar de suas vantagens, o sequenciamento também apresenta algumas limitações. Estima-se que cerca de 20% dos casos de RTT clássicos não tenham mutação nos exons 3 e 4 identificadas por sequenciamento. Desses, 5-10% são atribuídos a grandes deleções de um ou mais exons ou até do gene *MECP2* inteiro. Dos restantes, uma pequena parcela (cerca de 1%) tem mutações no exon 1, e nos outros a mutação pode estar em um segundo gene, chamado *CDKL5*. Estima-se que mutações em *CDKL5* sejam responsáveis por cerca de 6% dos casos atípicos de RTT, e estejam especificamente associadas a convulsões antes dos seis meses de idade¹⁹⁻²².

Tabela 2
Mutações patogênicas que não fazem parte do banco de dados RettBASE¹⁷

Alteração no DNA	Alteração na proteína	Testados os pais
c.39dupA	p.Glu14fs	não
c.151delC	p.Pro50fs	não
c.386dupG	p.Lys129fs	não
c.859delG	p.Val288fs	sim
c.915G>T	p.Lys305Asn	sim
c.1116_1186del	p.Ser373fs	sim
c.1164_1175delinsT	p.Pro388fs	sim
c.1460G>C	p.X487SerextX27	não

CONCLUSÃO

Nesses seis anos de experiência com o diagnóstico molecular da RTT, concluímos que o sequenciamento direto dos exons 3 e 4 é o método mais eficaz para detecção de mutações patogênicas no gene *MECP2*. Existem poucas mutações patogênicas identificadas por sequenciamento nos exons 1 e 2²³⁻²⁵ e nenhuma foi encontrada no nosso estudo. Com o objetivo de melhorar ainda mais a qualidade do nosso serviço de diagnóstico de RTT, estamos implementando o teste para detecção de grandes deleções no gene *MECP2* pela técnica de MLPA. Assim, esperamos oferecer uma cobertura mais completa das mutações patogências em *MECP2* associadas a RTT.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem às pessoas envolvidas na realização dos testes moleculares: Dra. Martha Cozzo-Lima, Dra. Cibele Biondo, Bach. Camila Juncansen, Bach. Kelly Bagatini e o apoio financeiro da FAPESP/CEPID e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Laurvick CL, de Klerk N, Bower C, Christodoulou J, Ravine D, Ellaway C, et al. Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiology. *J Pediatr* 2006;148:347-52.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.10.037>
- Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B. Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr* 2001;90:34-9.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2001.tb00252.x>
- Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome: comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 2002;6:293-7.
<http://dx.doi.org/10.1053/ejpn.2002.0612>
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185-8.
<http://dx.doi.org/10.1038/13810>
- Kammoun F, de Roux N, Boespflug-Tanguy O, Vallée L, Seng R, Tardieu M, et al. Screening of MECP2 coding sequence in patients with phenotypes of decreasing likelihood for Rett syndrome: a cohort of 171 cases. *J Med Genet* 2004;41:85.
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2003.014480>
- Li MR, Pan H, Bao XH, Zhang YZ, Wu XR. MECP2 and CDKL5 gene mutation analysis in Chinese patients with Rett syndrome. *J Hum Genet* 2007;52:38-47.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10038-006-0079-0>
- Zahorakova D, Rosipal R, Hadac J, Zumrova A, Bzduch V, Misovicova N, et al. Mutation analysis of the MECP2 gene in patients of Slavic origin with Rett syndrome: Novel mutations and polymorphisms. *J Hum Genet* 2007;52:342-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10038-007-0121-x>
- Kleefstra T, Yntema HG, Nillesen WM, Oudakker AR, Mullaart RA, Geerdink N, et al. MECP2 analysis in mentally retarded patients: implications for routine DNA diagnostics. *Eur J Hum Genet* 2004;12:24-8.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201080>
- Ylisaukko-Oja T, Rehnström K, Vanhala R, Kempas E, von Koskull H, Tengström C, et al. MECP2 mutation analysis in patients with mental retardation. *Am J Med Genet* 2005;132A:121-4.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.30416>
- Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, et al. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 2001;38:224-8.
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.38.4.224>
- Hitchens MP, Rickard S, Dhalla F, Fairbrother UL, de Vries BB, Winter R, et al. Investigation of UBE3a and MECP2 in Angelman syndrome (AS) and patients with features of AS. *Am J Med Genet* 2004;125A:167-72.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.20343>
- Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, et al. MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 2000;481:285-8.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01994-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01994-3)
- Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, et al. A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 2004;36:339-41.
<http://dx.doi.org/10.1038/ng1327>
<http://dx.doi.org/10.1038/ng0504-540b>
- Christodoulou J, Grimm A, Maher T, Bennets B. RettBASE: The IRSN MECP2 variation database-a new mutation database in evolution. *Hum Mutat* 2003;21:466-72.
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.10194>
- Schollen E, Smeets E, Deflem E, Fryns JP, Matthijs G. Gross rearrangements in the MECP2 gene in three patients with Rett syndrome: implications for routine diagnosis of Rett syndrome. *Hum Mutat* 2003;22:116-20.
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.10242>
- Scalza E, Longo I, Ottimo F, Speciale C, Sampieri K, Katzaki E, et al. MECP2 deletions and genotype-phenotype correlation in Rett syndrome. *Am*

- J Med Genet 2007;143A:2775-84.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.32002>
- 17.RettBASE: IRSF MECP2 Variation Database. Austrália: Western Sydney Genetics Program. (última atualização: 03/2011. Citado em 04/2011). Disponível em: <http://mecp2.chw.edu.au/>
- 18.Carvalho CM, Camargos W, Pena SD. Multiplex protocol suitable for screening for MECP2 mutations in girls with mental retardation. Clin Chem 2006;52(3):539-40.
<http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.060178>
- 19.Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Grewe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. Am J Hum Genet 2004;75:1149-54.
<http://dx.doi.org/10.1086/426460>
- 20.Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, et al. Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. Am J Hum Genet 2004;75:1079-93.
<http://dx.doi.org/10.1086/426462>
- 21.Evans JC, Archer HL, Colley JP, Ravn K, Nielsen JB, Kerr A, et al. Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. Eur J Hum Genet 2005a;13:1113-20.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201451>
- 22.Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. J Med Genet 2005;42:103-7.
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2004.026237>
- 23.Amir RE, Fang P, Yu Z, Glaze DG, Percy AK, Zoghbi HY, et al. Mutations in exon 1 of MECP2 are a rare cause of Rett syndrome. J Med Genet 2005;42:e15.
<http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2004.026161>
- 24.Evans JC, Archer HL, Whatley SD, Kerr A, Clarke A, Butler R. Variation in exon 1 coding region and promoter of MECP2 in Rett syndrome and controls. Eur J Hum Genet 2005b;13:124-6.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201270>
- 25.Ravn K, Nielsen JB, Skjeldal OH, Kerr A, Hulten M, Schwartz M. Large genomic rearrangements in MECP2. Hum Mutat 2005;25:324.
<http://dx.doi.org/10.1002/humu.9320>