

## SECUENCIAMIENTO DEL GENOMA HUMANO

---

*María Amparo Acosta Aragón \**

**D**entro del núcleo de cada célula somática, en dos versiones distribuidas en 23 cromosomas, se encuentra la información genética. El total de la información se encuentra en tres billones de letras en un código de 4 letras. En las regiones llamadas genes, las cuales constituyen el 5% del total, este código especifica la estructura de 80.000 ácidos ribonucleicos o RNAm, que a su vez especifican igual número de proteínas. Una vez en cada cien letras, el código presenta variación intrínseca. Entonces en forma gruesa puede haber 3 millones de diferencias entre un set de cromosomas y otro. Una pequeña proporción de éstas ocurre para las alteraciones fenotípicas llamadas enfermedades. Otra pequeña proporción (pero en número muy importante) ocurre para las diferencias encontradas en la susceptibilidad genética heredada a las enfermedades. En promedio se estima que cada uno de nosotros es portador de 4 a 5 mutaciones severas, la mayoría de ellas en forma recesiva, y también de un gran número de variantes que aumentan el riesgo para algunas enfermedades. Por otro lado la secuencia es idéntica en el 99.9% de un set de cromosomas con respecto al otro. Esto es lo que hace razonable hablar de un genoma humano, al menos con el propósito de determinar una secuencia completa representativa, para identificar los genes.

El proyecto genoma humano se inaugura oficialmente el 1 de octubre de 1990, en los Estados Unidos por el Instituto Nacional de Salud (a través del centro nacional para la investigación del genoma humano) y el departamento de energía, colocando como meta el año 2005 con el fin de presentar completamente secuenciado el genoma humano, con un costo total de US\$ 3.000 millones. De acuerdo a los acontecimientos actuales la meta se logra con cinco años de anticipación. Aunque el trabajo no tiene como fin secuenciar todos los polimorfismos humanos (el 0.1% de diferencias existentes entre un set de cromosomas y otro), este proceso acelera el descubrimiento de variaciones específicas que tienen consecuencias desde el punto de vista clínico. Al respecto los investigadores han encontrado repetidamente que un cambio mínimo en el genotipo, tiene profundos efectos fenotípicos. Un ejemplo clásico es la anemia de células falciformes en la cual el nucleótido o base adenina, dentro del código de tres billones de letras, es reemplazada por una timina, lo cual altera la estructura de la B-globina.

En forma mas reciente se ha encontrado otro ejemplo en la acondroplasia, en la cual todos los pacientes tienen la misma mutación, el cambio de una citosina por una timina, afectando el gen para el receptor del factor 3 de

---

\* Médica Genetista, Profesora de genética. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca.

crecimiento de fibroblastos; o la fibrosis quística, la cual en la mayoría de los casos surge de una delección de CTT, lo cual afecta el transporte de cloro.

Casi todos los días los investigadores y sus pacientes escuchan de tales descubrimientos, en los cuales un grupo de investigadores ha mapeado un gen relacionado con una enfermedad o su localización cromosómica, o ha determinado su secuencia completa o ha descubierto una prueba para detectar una enfermedad de alto riesgo.

En algunos casos se pueden delinear estrategias de prevención como cambios en el estilo de vida o algunas veces drogas. En otras el detectar un elevado riesgo no está acompañado de una intervención benéfica. Este problema se observa en desórdenes donde intervienen varios genes (poligénicos) complejos, grupo en el cual se incluye la diabetes, la hipertensión y la mayoría de los desórdenes comunes. En estos casos la predicción de riesgo podría tener mayor importancia desde el punto de vista estadístico, añadiendo aún mayor complejidad para el asesoramiento y el seguimiento. Fig. 1

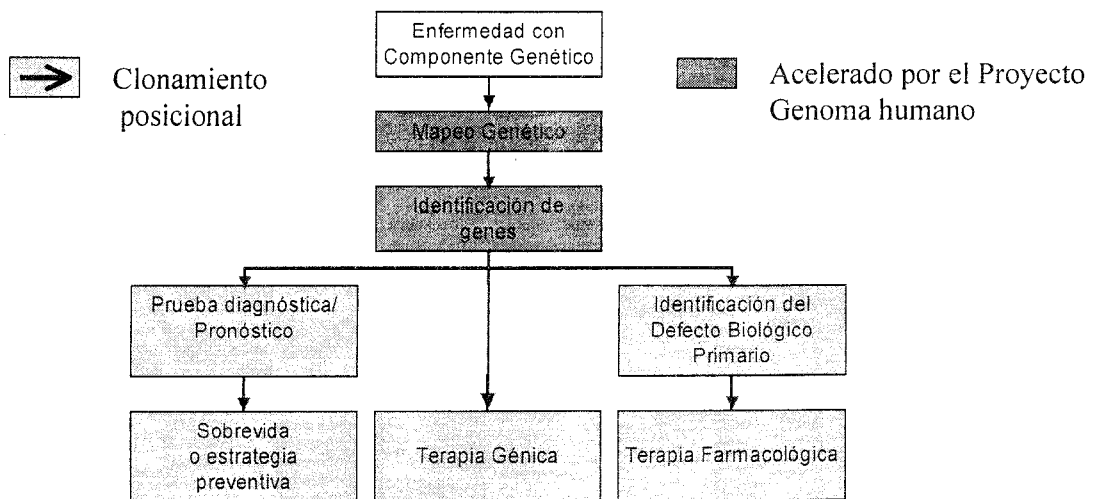
### MAPEO GENÉTICO

En principio, para cualquier segmento cromosómico, el aclarar su constitución se hace por una serie de mapas. El primer tipo de mapa es el genético o de

ligamiento, en el cual las distancias representan la posibilidad de que el gen de una enfermedad y otro gen llamado marcador se hereden juntos, en familias que se estudian. Los marcadores que se encuentran en un mismo cromosoma tienden a heredarse juntos aunque no en igual proporción dependiendo de eventos de recombinación que ocurren cuando el cromosoma se rompe e intercambia material genético con su cromosoma homólogo.

En el mapa genético la unidad de distancia es el centimorgan (cM), representando 1% de posibilidad de recombinación durante una meiosis (o en otras palabras 99% de posibilidad de que dos marcadores se hereden juntos). En promedio 1cM equivale a un millón de pares de bases (1 Mb) de distancia en un mapa físico, de tal manera que las distancias genéticas son relativas con respecto a las distancias físicas, porque algunas regiones de los cromosomas recombinan más que otras.

Una de las metas iniciales del proyecto genoma la cual se cumplió en el año 1995 fué tener un mapa genético con marcadores cuya distancia no supere a los 2-5cM. Se espera tener cada vez un mapa diez veces mas empaquetado que el original. Como consecuencia de lo anterior un investigador recolectará muestras de DNA de una familia afectada por una enfermedad, y es muy probable que encuentre que el gen de la enfermedad se hereda con un marcador genético cuya localización en el mapa es conocida en forma precisa.



Por lo general, un tamizaje con 300 a 400 marcadores es lo que se usa para investigar ligamiento y por lo tanto este mapa de gran densidad deberá ser usado para investigar áreas que prometen tener el gen de la enfermedad. Si se tienen muchas familias disponibles para análisis y esta enfermedad presenta un patrón de herencia mendeliana, se podría mapear el gen a 1-2cM de distancia. Para las condiciones de tipo poligénico la localización será con frecuencia menos exacta.

Dentro de los 10.000 marcadores que se encuentran en el mapa actual, cerca del 75% son repeticiones de secuencias única (SSRs), las cuales algunas veces han sido llamadas microsátélites. La mayoría de estas repeticiones son de dinucleótidos del tipo CA. En forma general estas repeticiones varían entre un individuo y otro en su número. Por ejemplo en un cromosoma pueden haber 23 repeticiones y en el cromosoma homólogo 19. En el par de cromosomas de otra persona, el número de repeticiones puede ser de 20 y 24. Los SSRs son útiles precisamente por que ellos son altamente variables (polimórficos): por lo tanto la presencia de un número particular de repeticiones puede ser seguida en una genealogía. De tal manera que el investigador utiliza la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para amplificar la región de las repeticiones. Una electroforesis realizada en un gel puede mostrar su tamaño, sin necesidad de conocer la secuencia.

La desventaja es que la electroforesis en un gel se requiere para todo y en el momento este proceso se encuentra modestamente automatizado, lo cual aumenta el trabajo y el costo a un proyecto de investigación, especialmente si cientos de muestras de DNA se requieren para analizar en cada una de ellas cientos de marcadores, como es de rutina en el estudio de las enfermedades poligénicas. De hecho que para el futuro los marcadores mas utilizados sean los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) en los cuales un cromosoma muestra una C por ejemplo y el otro tiene una G (guanina). Tales diferencias pueden ser encontradas una vez en cientos de bases. Individualmente son menos informativos que los SSRs, ya que son menos polimórficos. Sin embargo ellos serían mas fáciles de analizar por los métodos automatizados que ahora se encuentran en desarrollo. Uno puede imaginarse 5 veces mas pruebas haciendo un proyecto mas económico y potencialmente una localización de un gen mas exacta.

## MAPEO FÍSICO

En un mapa físico las distancias entre los marcadores consecutivos no se definen por la probabilidad de heredarse juntos (ligados) sino por las distancias físicas reales en el DNA, medidas en pares de bases, kilobases (Kb) o megabases (Mb). En el proyecto genoma humano la meta es tener marcadores físicos a una distancia promedio de 100 kb, de tal forma que se requieren en total unos 30.000 marcadores. Esto podría llevar a su vez a la construcción de un grupo de fragmentos de DNA clonados (insertados en un vector que los amplifica), en donde este grupo de fragmentos abarque todo el genoma. De hecho mas de 25.000 marcadores ya se encuentran ubicados en el mapa y mas del 95% del genoma se encuentra actualmente validado con grupos de fragmentos de DNA clonados que se sobrelapan unos con otros.

En los Estados Unidos el tipo de marcador preferido para el mapeo físico son los sitios rotulados de secuencias conocidas o STS. Cada uno no es mas que el par de primers

necesario para que una prueba de RCR amplifique una secuencia en un lugar particular en el genoma humano (una secuencia típica de 60 a 10.000 pb de longitud). Fig. 2

## SECUENCIAMIENTO DEL DNA

Con un mapa físico detallado que proporcione una buena guía el próximo paso es el secuenciamiento a gran escala: la identificación en grandes y extensos fragmentos del código genético. La fase de secuenciamiento del proyecto genoma humano (o sea el descubrimiento de los tres billones de letras) es lo que se ha logrado en el presente año.

En 1990 el costo por nucleótido era prohibitivo US\$5; posteriormente bajó a US\$1 y continúa bajando. Fig. 3

## CONSECUENCIAS CLÍNICAS

Desde el momento actual se ve el impacto que la biología molecular tiene sobre la práctica clínica. De hecho ya se tiene éxito en el diagnóstico de ciertas enfermedades tales como el cáncer. Los pacientes le comentan a

Figura. 2

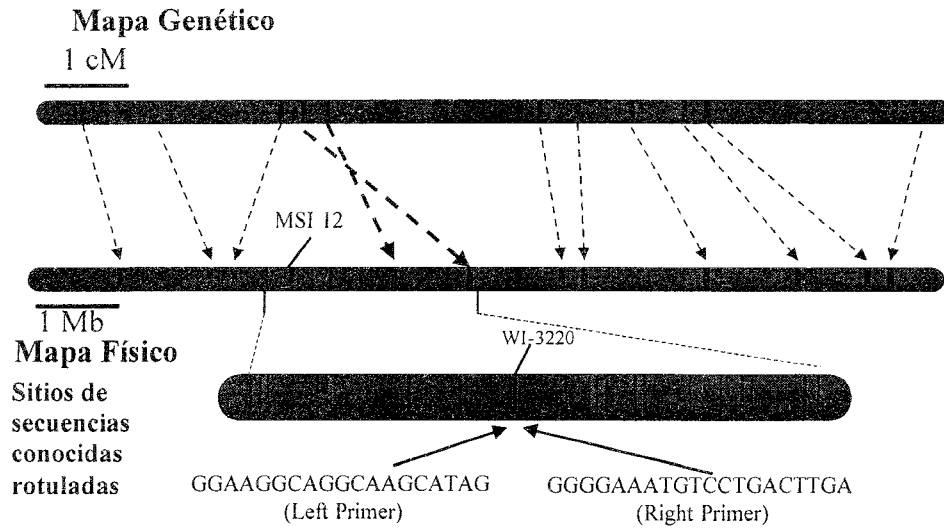
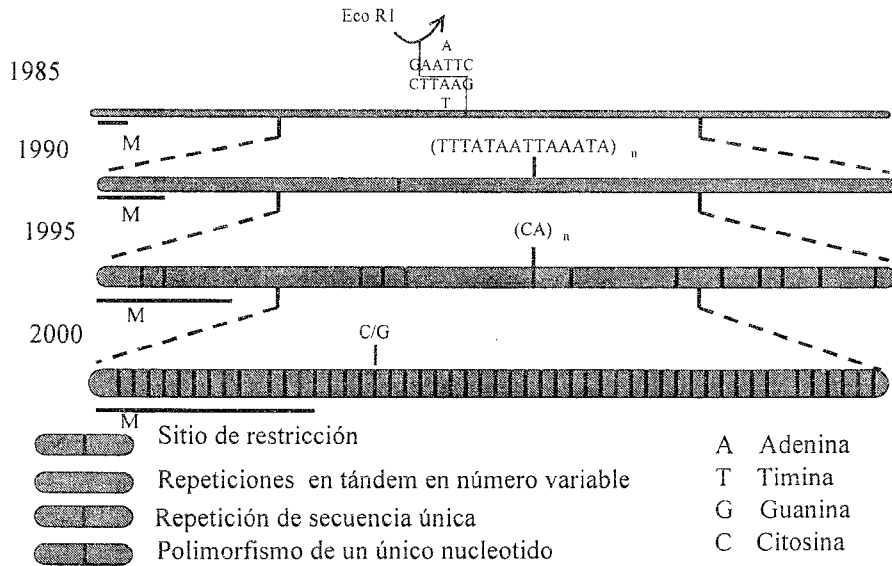


Figura. 3



su médico que tienen esta enfermedad en la familia y preguntan si ellos pueden ser analizados. Para el cáncer de mama y de colon hay mucho interés dado que hay dos genes del cáncer de mama muy bien identificados e igualmente 4 genes implicados en el cáncer de colon no polipoide.

En un futuro no muy lejano la prevención primaria se basará en aconsejar o guiar a los pacientes saludables en decidir si deben someterse a estudios que definan su susceptibilidad genética a ciertas enfermedades.

Supongamos que un paciente informa que su madre murió de cáncer de seno y que su tía tiene cáncer de ovario. Ella además ha oído hablar de que las mutaciones en el gen que produce cáncer de seno ya pueden ser detectadas. Antes de que cualquier prueba se lleve a cabo el médico debe realizar una historia familiar detallada, para estar seguro del diagnóstico y del riesgo. La realización de la prueba debe estar precedida por un asesoramiento al respecto. En forma particular, el médico debe explicar que una mutación en el gen BRCA1 lleva a tener un riesgo elevado para desarrollar cáncer de mama y también cáncer de ovario (tanto como un 85% y un 50% respectivamente). En familias con historia de cáncer de mama o de ovario, una persona tiene el riesgo en 45 % de tener una mutación en el gen BRCA1; que si además la mutación se encuentra presente en la madre y en la tía, la posibilidad de tenerla (por herencia mendeliana) es del 50%.

El médico deberá también explicar que se han encontrado mas de 100 mutaciones en el gen BRCA1: de tal manera que la prueba o test deberá cubrir todo el gen para detectar cualquiera de las 100 mutaciones y que si el resultado es negativo, podría no ser significativo. Además un resultado verdaderamente negativo podría tener un valor limitado, dado que una mujer cualquiera que no tenga una mutación en el gen BRCA1 podría tener el riesgo del 12% de desarrollar cáncer de mama, que tiene toda mujer.

Un hallazgo positivo podría tener cierto valor, ya que el paciente asume de que si el test existe, también deben haberse desarrollado estrategias preventivas. Por ejemplo el uso frecuente de la mamografía. Desafortunadamente no se sabe cuanto este tipo de medidas pueden reducir el riesgo de morir de cáncer de seno. Algunas mujeres con una fuerte historia familiar de cáncer de mama, optan por la mastectomía profiláctica, pero algunas veces el cáncer de mama se desarrolla en el tejido

epitelial remanente. Para el cáncer de ovario no hay métodos de tamizaje de rutina, la cirugía viene a ser entonces la única opción profiláctica, pero sin un valor seguro, dado que a veces se encuentra carcinomatosis peritoneal muchos años después en mujeres en las que ambos ovarios han sido extirpados.

También existe la posibilidad de que personas sanas, sin historia familiar se sometan a pruebas para detectar un riesgo aumentado para una enfermedad, encontrándose en aquellos casos que son positivos, con el problema de que sus seguros de vida se incrementan a unos costos que no pueden ser considerados como aceptables. Este peligro debe ser explicado antes de someterse a la prueba. Hay leyes en algunos estados de Estados Unidos, que obligan a los aseguradores a no excluir a las personas del cubrimiento con base a su información genética; este es un gran avance, pero en muchos casos no evitará el alto costo que puede cobrar una aseguradora.

La mayoría de las enfermedades no son monogénicas, sino con un patrón de herencia complejo. De igual manera se sabe que estas enfermedades, como la diabetes, la hipertensión, la enfermedad coronaria, la obesidad, la enfermedad de Alzheimer, la esquizofrenia, la enfermedad maniaco depresiva y las formas más comunes de cáncer, entre otras, presentan agregación familiar. En los próximos años tal como sucedió con el cáncer de mama o de colon, se desarrollarán pruebas genéticas de susceptibilidad. En los próximos 10 años tales pruebas estarán disponibles para la mayoría de enfermedades comunes.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, se podría desarrollar un programa de medicina preventiva, en el cual la gente adulta saludable puedan leer y aprender acerca de los riesgos individuales para 40 a 50 enfermedades y que ellos decidieran cuando quieren ampliar esta información. Ellos podrían entonces decidir hacer pruebas inclusive para enfermedades para las cuales no existe ninguna estrategia preventiva. Otros decidirán hacer pruebas sólo para aquellas enfermedades que tengan algún tipo de tratamiento y otros se negarán a conocer cualquier información. También esta decisión deberá ser respetada.

Con el tiempo, los desórdenes de origen genético podrán ser tratados, lo cual disminuirá los dilemas acerca de las pruebas. En algunas enfermedades la terapia génica puede llevar al reemplazo en los tejidos de una secuencia de DNA que causa o que lleva al riesgo de tener la

enfermedad. En otros desórdenes en los cuales se tiene un conocimiento preciso del defecto biomolecular, se harán drogas mas efectivas.

Todavía no se conocen bien la serie de eventos que ocurren para que aparezca una determinada enfermedad. El cáncer ocurre como consecuencia de una serie de mutaciones somáticas, de tal manera que actualmente se conoce un catálogo de 100 oncogenes, en cualquiera de los cuales una mutación da como resultado un crecimiento celular inapropiado. Hay también un catálogo de 30 a 40 antioncogenes o genes supresores tumorales, en los cuales el daño de la doble copia también conduce a un crecimiento celular inapropiado. Tales conocimientos están llevando a la investigación de otras terapias, incluyendo un grupo de inhibidores del oncogen RAS que ahora están siendo probados contra el cáncer de colon. Se cree que en la próxima década pruebas sofisticadas de diagnóstico van a ser las intervenciones más potentes.

### INTERÉS EN EL ESTUDIO DEL GENOMA

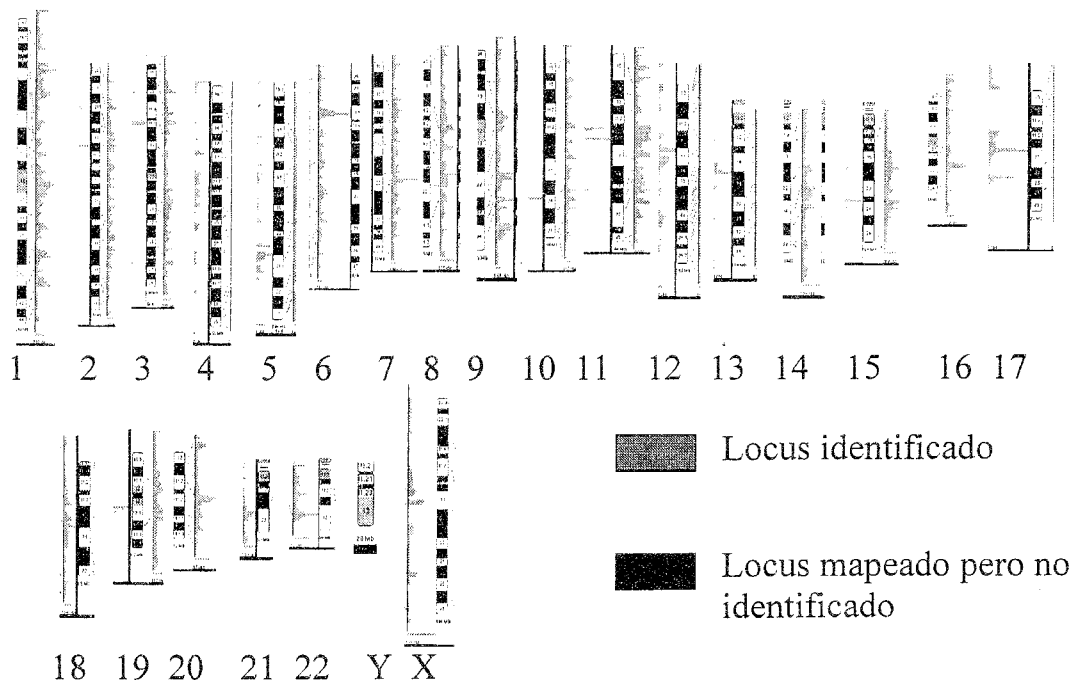
La consecuencia final se traducirá en la investigación básica en biología teniendo el conocimiento del genoma completo. Todavía no se conoce como las células res-

ponden a un estímulo dado en un tiempo dado como respuesta a la expresión de un gen. Si un investigador estudiara la inflamación podría escoger medir el RNAm para una señal de transducción de una quinasa en varios momentos después de que un macrófago haya sido estimulado por una citoquina.

La tecnología desarrollada actualmente permitiría al investigador escoger un grupo de clones que representen cientos de genes. Se podría aislar una muestra de RNA después de examinar una célula marcada con un fluorocromo e hibridizarlo. La intensidad de la hibridación puede conducir al investigador a entender que genes se encuentran activos (como lo revela el RNAm en el material extraído).

El procedimiento conduciría a observar las muestras de RNA obtenidas a diferentes intervalos después de la estimulación celular, de tal manera que el investigador podría determinar que genes generan el tapiz de respuestas celulares en un momento dado o en varios momentos. Uno se puede imaginar la investigación de los mosaicos de expresión usando clones de librerías de DNAc existentes. Tales exploraciones no se encuentran dentro de los objetivos del proyecto genoma humano, pero podrán ser las metas del proyecto genoma II o para investigadores interesados en el estudio del genoma. Fig.4

Figura. 4



## IMPACTO DEL PROYECTO DEL GENOMA HUMANO

El atlas del genoma humano revolucionará la práctica de la medicina y de la investigación biológica durante e incluso más allá del siglo XXI. Eventualmente se encontrarán todos los genes y se desarrollarán diagnósticos precisos para la mayoría de las enfermedades genéticas. Además facilitará el desarrollo de modelos animales para investigar la enfermedad humana y para entender la función de los genes en los estados de salud y enfermedad.

Ya se han identificado genes individuales asociados con algunas enfermedades tales como la fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne, distrofia miotónica, neurofibromatosis, síndrome del X frágil, enfermedad de Huntington y retinoblastoma, entre otras. Según se va avanzando en la investigación, se descubrirán también los mecanismos de las enfermedades causadas por varios genes, o por genes en su interacción con el medio ambiente. Se ha descubierto una predisposición genética a padecer enfermedades tan importantes como las cardiovasculares, la diabetes y varios tipos de cáncer.

La identificación de estos genes y sus proteínas, prepararán el camino hacia tratamientos mas efectivos o nuevos como la terapia génica y hacia medidas preventivas. Cuando se conozca mejor la organización del genoma y la regulación de los genes, se empezará a entender como un ser humano puede desarrollarse a partir de una sola célula hasta convertirse en un individuo adulto, por qué este proceso se altera en ocasiones y que cambios tienen lugar con el envejecimiento de las personas.

Las técnicas desarrolladas para la investigación del genoma, también encontrarán muchas aplicaciones en la industria y en proyectos para trazar el mapa de los genomas de animales de granja y de productos agrícolas de gran importancia económica y eventualmente, permitirán mejorarlos.

Aunque la investigación del genoma en sí misma no representa ningún dilema ético nuevo, la utilización de los datos que van surgiendo de este proyecto, sí que obliga a plantearse cuestiones que habrá que resolver antes de que los datos se acumulen de una forma considerable. Por ejemplo, si un análisis puede predecir que una persona morirá joven de una enfermedad genética incurable

ble y devastadora, se hará esa persona el análisis? Y cuál será su actitud si ese mismo análisis puede informarle de que pasará o no esa enfermedad a su descendencia? Le gustaría a alguien saber que debido a sus genes, su trabajo en una planta química puede originarle cáncer? Le gustaría a esa persona que los responsables de esa planta o su compañía de seguros conocieran su predisposición?

Estas son algunas de las cuestiones que ahora empezamos a plantearnos como consecuencia de los avances tecnológicos, en genética humana. Sin embargo, según se van conociendo más datos, va siendo posible analizar a un individuo sobre un mayor número de problemas genéticos, problemas que pueden afectar a su vida, a su capacidad para realizar determinados trabajos, o al modo en que le va afectar la ingesta de alcohol o de medicamentos.

De hecho, se van a desarrollar mucho más rápidamente los análisis para detectar enfermedades genéticas que sus tratamientos. Aunque la capacidad para obtener información a partir del DNA humano, no es un objetivo directo del proyecto genoma humano, la tecnología que se desarrolle dentro del proyecto va a aumentar la cantidad de información que se puede obtener de ese DNA. Por lo tanto como va a afectar nuestra intimidad personal y familiar, a nuestro nivel de salud, a la cobertura de nuestros seguros, a nuestra vida cotidiana, e incluso a la actitud social hacia nosotros, esta información genética detallada y sensible?. estos problemas no son nuevos, la sociedad se está enfrentando a ellos desde la introducción de los análisis para determinar la exposición al SIDA. Las leyes garantizan el derecho a la intimidad y protegen contra la discriminación, pero cómo se van aplicar estas leyes a la información del genoma? Este mayor conocimiento del genoma humano, va aumentar la tolerancia de la sociedad hacia las personas con diferencias genéticas, o va aumentar la discriminación?

Para atender debidamente el desarrollo de unas líneas de actuación adecuadas sobre los aspectos éticos o legales del proyecto genoma humano, el National Center for Human Genome Research dedica 5% de su presupuesto anual para la organización de conferencias, proyectos de investigación para identificar y considerar los temas mas relevantes y actividades dirigidas a mantener la sociedad informada de todos estos aspectos. El objetivo final es salvaguardar a los individuos y a la sociedad de los abusos de la información genética.

El proyecto genoma humano, va a revelar los detalles moleculares de la especie humana, y eso nos permitirá maravillarnos de la similitud existente entre nosotros, y al mismo tiempo celebrar nuestra diversidad.

### ENFERMEDADES GENÉTICAS EN LAS CUALES EL GEN HA SIDO IDENTIFICADO POR CLONAMIENTO POSICIONAL

#### 1986

Enfermedad granulomatosa crónica  
Distrofia muscular de Duchenne  
Retinoblastoma

#### 1989

Fibrosis quística

#### 1990

Tumor de Wilms  
Neurofibromatosis tipo I  
Factor determinante testicular  
Choirodermia

#### 1991

Síndrome de X frágil  
Poliposis familiar  
Síndrome de Kallmann  
Aniridia

#### 1992

Distrofia miotónica  
Síndrome de Lowe  
Síndrome de Norrie

#### 1993

Enfermedad de Menkes  
Agammaglobulinemia ligada al cromosoma X  
Deficiencia de Glicerol quinasa  
Adrenoleucodistrofia  
Neurofibromatosis tipo II  
Enfermedad de Huntington  
Enfermedad de Von Hippel-Lindau  
Ataxia espinocerebelosa I  
Lisencefalia  
Enfermedad de Wilson  
Esclerosis tuberosa

#### 1994

Síndrome de McLeod

Enfermedad poliúística renal tipo I  
Atrofia dentorubropalida  
Síndrome de X frágil E  
Acondroplasia  
Síndrome de Wiskott-Aldrich  
Cáncer de mama/cáncer de ovario de inicio temprano (BRCA1)  
Displasia diastrófica  
Ataxia espinocerebelosa III  
Síndrome de Aarskog-Scott  
Hipoplasia adrenal congénita  
Distrofia muscular de Emery-Dreifuss  
Enfermedad de Machado-Joseph

#### 1995

Atrofia muscular espinal  
Condrodisplasia punctata  
Distrofia muscular cintura-miembro  
Albinismo ocular  
Ataxia telangiectasia  
Enfermedad de Alzheimer (cromosoma 14)  
Enfermedad de Alzheimer (cromosoma 1)  
Raquitismo hipofosfatémico  
Exostosis hereditaria múltiple  
Síndrome de Bloom  
Cáncer de mama de inicio temprano (BRCA2)

#### 1996

Ataxia de Friedrich  
Epilepsia mioclónica progresiva  
Síndrome de Treacher-Collins  
Síndrome de QT largo (cromosoma 11)  
Síndrome de BarthS  
Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel  
Síndrome de Werner  
Retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X  
Enfermedad poliúística renal tipo II  
Síndrome de nevus celular basal  
Miopatía miotubular ligada al cromosoma X  
Displasia ectodérmica anhidrótica  
Hemocromatosis  
Síndrome de Chediak-Higashi  
Exostosis hereditaria múltiple tipo II  
Anemia de Faconi  
Síndrome de Hermansky-Pudlak  
Ataxia espinocerebelosa tipo II  
CADASIL (isquemia hereditaria)  
Síndrome de Reiger  
Diabetes juvenil (cromosoma 12)



## BIBLIOGRAFÍA

1. **Boguski MS.** *Hunting for genes in computer data bases.* *New Engl J Med* 333:645.1995
2. **Collins FS.** Positional cloning moves from perdditional to traditional. *Nat. Genet* 9:347, 1995
3. **Collins FS.** BRCA1-Lots of mutations, lots of dilemmas (editorial). *New Engl J Med* 334:186.1996
4. **Cordell HJ, Todd JA.** Multifactorial inheritance in type 1 diabetes. *Trends Genet* 11:199.1995
5. **Green ED, Cox DR, Myers RM.** The Human Genome Project and its impact on the study of human disease. In the *Metabolic and Molecular Bases of inherited Disease*. 7th de, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds). McGraw-Hill. New York. 1995. pp401-436
6. **Guyer MS, Collins FS.** How is the Human Genome Project doing, and what have we learned so far? *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10841.1995
7. **Hudson KL et al.** Genetic discrimination and health insurance: An urgent need for reform. *Science* 270:391.1995
8. **Lander ES.** The new genomics: Global views of biology. *Science* 274:536.1996
9. **Schuler GD et al.** A gene map of the human genomic. *Science* 274:540.1996
10. **Uberbacher EC, Mural RJ.** Locating protein-coding regions in human DNA sequences by a multiple sensor neural network approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:11261