

상대적 게놈 보합법(Comparative Genomic Hybridization, CGH)으로 확인된 1번 염색체 장완부 일부에서 중복 및 삼중복 염색체 이상을 보인 골수이형성증후군 1례

연세대학교 의과대학 임상병리학과교실¹, 내과학교실²

최종락¹ · 이경아¹ · 박규은¹ · 송경순¹ · 고윤웅²

Reassessment of a Dup(1)(q21q32), Trp(1)(q21q32) in a Case of Myelodysplastic Syndrome by CGH(Comparative Genomic Hybridization)

Jong Rak Choi, M.D.¹, Kyung A Lee, M.D.¹, Quehn Park, M.D.¹
Kyung Soon Song, M.D.¹ and Yun Woong Ko, M.D.²

*Department of Clinical Pathology¹ and Internal Medicine²,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

Acquired partial duplication or triplication of the long arm of human chromosome 1 has been observed rarely in myelodysplastic syndrome(MDS). We describe a dup(1)(q21q32), trp(1)(q21q32) in a patient with refractory anemia of MDS. A 51-year-old man was admitted for dyspnea. Five months ago, he was diagnosed with myelodysplastic syndrome (RA) and iron deficiency anemia and had been treated with iron, vitamin B12, oxymetholone, and prednisolone. The karyotype of trypsin-Giemsa-banded metaphase cells obtained from bone marrow aspirates was 46,XY,dup(1)(q21q32)×2[5]/46,XY,trp(1)(q21q32)[2]/46,XY, dup(1)(q21q32),trp(1)(q21q32)[2] and confirmed the amplification of 1q21-1q32 by CGH (comparative genomic hybridization). In this assay, test and reference DNAs are labeled with FITC and Texas Red, respectively and co-hybridized to normal metaphase chromosomes. Ratio profiles of each individual chromosome were analyzed using a Quips-XL software(Vysis, Downers Grove, IL, USA). The thresholds of gain and loss were defined 1.2 and 0.8, respectively.

Key Words : Myelodysplastic syndrome, dup(1)(q21q32), trp(1)(q21q32), Comparative genomic hybridization

서론

최종락 : 135-270, 서울시 강남구 도곡동 146-92
영동세브란스병원 임상병리과
Tel : (02)3497-3571 Fax : (02)3462-9483

골수이형성증후군(myelodysplastic syndrome, MDS)은 골수에서 하나 이상의 조혈세포계(hematopoietic cell lines)의 성숙 장애와 범혈구감소증을 특징으로

하는 조혈모세포의 클론성 질환으로서¹⁻³⁾ 약 20~30%의 환자에서 급성골수성백혈병으로 진행하거나 진단 후 2년 내에 사망하는 것으로 보고되고 있다. 그렇지 않은 환자에서는 양호한 경과를 보여서 비교적 생존율이 높다.⁴⁾

골수이형성증후군에서 염색체 이상의 빈도는 30~73% 정도로 보고자에 따라 다양하다.⁴⁻⁷⁾ 염색체 이상의 특징은 첫째, 골수이형성증후군에는 특이한 염색체 이상이 없어서 비슷한 염색체 이상이 급성골수성백혈병, 골수증식성 질환 등의 다른 골수구성 질환에서도 보고된다. 둘째, 급성골수성백혈병, 골수증식성 질환에서 보일 수 있는 t(9;22), t(15;17), t(8;21), 그리고 inv(16) 등의 재배열이 골수이형성증후군에서는 나타나지 않는다.⁸⁾ 골수이형성증후군에서 흔히 보고되는 염색체 이상은 5번이나 7번 염색체의 홀염색체나 장완부 결손[-5, -7, del(5q), del(7q)], 8번 염색체의 삼염색체(+8), 17번 염색체 장완부의 등완염색체[i(17q)] 등이 있다.^{4,7)}

⁹⁾ 국내에서는 골수이형성증후군과 염색체 이상의 관계를 보고한 경우는 적으나, 이 등¹⁰⁾이 +21q를 동반한 골수이형성증후군을 보고한 바 있다.

저자들은 골수이형성증후군에서 지금까지 보고되지 않은 1번 염색체 장완부 일부에서 중복과 삼중복 염색체 이상을 보인 불응성빈혈(refractory anemia, RA) 1례를 상대적 게놈 보합법(comparative genomic hybridization, CGH)을 이용하여 확인하였기에 보고하는 바이다.

증 례

환 자: 설○○, 51세, 남자.

주 소: 약 3일간의 호흡곤란.

현병력: 환자는 내원 약 5개월 전에 빈혈 증상이 있어 골수 검사 시행하여 철결핍성빈혈을 동반한 골수이형성증후군 불응성빈혈로 진단받은 후 철분 및 비타민 제제 투여, 그리고 oxymetholone 과 prednisolone으로 치료하여 오다가 상기 증상을 주소로 입원하였다.

과거력: 15년 전 통풍으로 진단 받은 후 allopu-

rinol로 간헐적으로 치료함.

가족력: 특기할 만한 가족력 없음.

이학적 소견: 환자의 혈압은 수축기 혈압이 90 mmHg, 확장기 혈압이 60mmHg이었으며, 체온은 38.5℃이었다. 환자는 발열, 오한, 가래를 동반한 기침 등을 호소하였으며 우측폐의 청진음이 감소된 소견을 보였다.

검사 소견:

말초혈액검사: 내원 5개월 전에 시행한 말초혈액에서 적혈구는 심한 대소부동증과 이형적혈구증 및 저색소성빈혈 소견을 보였으며 소수의 표적 세포들이 관찰되었다. 백혈구와 혈소판은 숫적 감소와 함께 이형성 소견을 보였다. 내원 당시에도 5개월 전과 유사한 말초혈액 소견을 보였으며 통상혈액검사 소견은 Table 1과 같다.

골수검사: 내원 5개월 전에 시행한 골수 검사에서 세포총실도는 70%로 나이에 비해 증가되어 있었으며, 골수구계 세포와 적혈구계 세포의 비는 정상범위이었다. 아구세포는 전유핵세포의 3%였으며, 모든 조혈세포계의 이형성을 보였다. 골수 저장철은 매우 감소되어 있었다. 당시 염색체검사는 시행하지 않았다. 5개월 후 당시 골수 소견은 감소된 세포총실도(40%)를 보였으며, 상대적인 적혈구계 세포의 과형성 소견을 보였다. 아구세포는 전유핵세포의 2.7%였으며, 골수 저장철은 정상이었다.

혈액화학검사: 내원 5개월 전 혈액화학검사서 혈청 철과 비타민 B₁₂가 감소되었고 용혈성 빈혈 소견은 보이지 않았다. 철분 및 비타민 제제 투여, 그리고 oxymetholone과 prednisolone으로 치료한 후 내원 당시는 혈청 철과 비타민 B₁₂는 정상화되었다(Table 1).

세포유전학검사(cytogenetic study): 골수 검체에 대한 배양 및 수확은 Le Beau 등¹¹⁾의 방법을 변형한 mitogen 비자극 24시간 배양법을 사용하였다. 중기 염색체를 trypsin-Giemsa banding 법으로 염색한 후 핵형 및 영상분석은 Quips-XL software (Vysis, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 시행하였다. 결과의 판독은 ISCN(International System for Human Cytogenetic Nomenclature)¹²⁾에 따

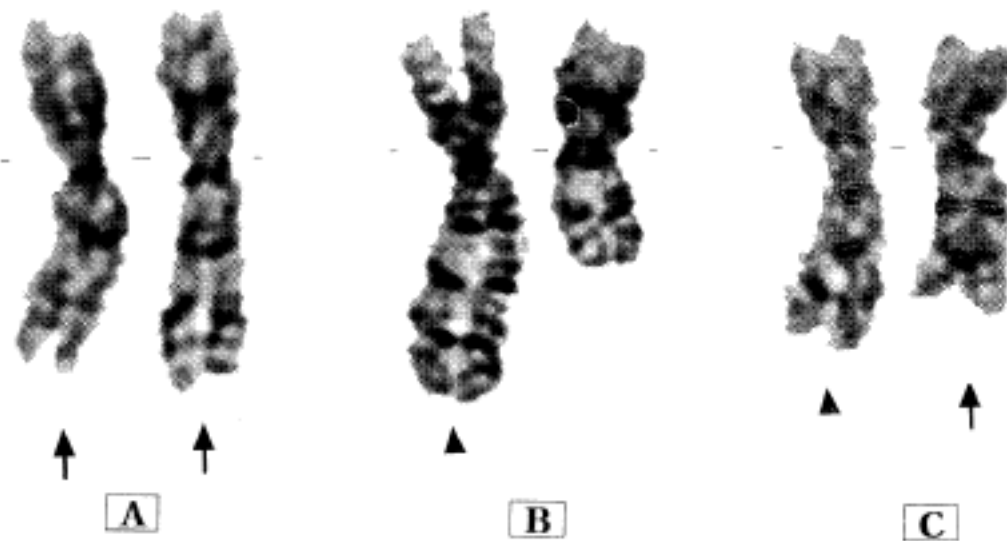


Fig. 1. Partial karyotypes of trypsin-Giemsa-banded metaphase cells obtained from bone marrow aspirates. A : 46,XY,dup(1)(q21q32)×2 [5], B : 46,XY,trip(1)(q21q32)[2], C : 46,XY,dup(1)(q21q32),trip(1)(q21q32)[2]. The duplicated and triplicated chromosomes are identified with arrows and arrow heads, respectively.

Table 1. Laboratory Findings

Parameter	Results	
	5 months before admission	At admission
WBC ($\times 10^9/L$)	3.7	5.0
RBC ($\times 10^{12}/L$)	2.93	2.70
Hb (g/L)	6.3	8.3
Hct (%)	22.3	26.1
MCV	79.5	96.5
MCH	21.5	30.6
MCHC	27.0	31.3
Platelet ($\times 10^9/L$)	46	92
Differential count(%)		
Neutrophil	55.7	71.7
Lymphocyte	34.9	19.0
Monocyte	8.6	7.3
Eosinophil	0.5	0.2
Basophil	0.3	0.6
Luc		1.2
Iron ($\mu g/dL$)	12	55
TIBC ($\mu g/dL$)	306	197
Ferritin ($\mu g/L$)	16.9	1,647
Vit. B ₁₂ (pg/mL)	77.5	756
Folate (ng/mL)	5.57	2.64
Haptoglobin (mg/dL)	293	
DAT	negative	

라 분석하였다.

염색체 핵형 분석 결과는 46,XY,dup(1)(q21q32)×2[5]/46,XY,trip(1)(q21q32)[2]/46,XY,dup(1)(q21q32),trip(1)(q21q32)[2]이었다(Fig. 1).

상대적 게놈 보합법 검사: 검체는 세포유전학검사를 의뢰한 골수 흡입액에서 DNA를 추출하여 사용하였다. 추출한 DNA에서 nick translation과 보합반응은 Vysis 회사 제품을 사용하여 설명서에 따라 시행하였다. 방법을 간략히 요약하면 다음과 같다. FITC(fluorescein isothiocyanate)가 직접 부착된 dUTP를 검사하려고 하는 DNA 1 μ g에 nick translation시켰다. 이때 얻어지는 probe의 크기는 300~3,000bp 정도로 유지하였다. FITC가 부착된 검사 DNA 200ng과 Texas Red가 부착된 정상 대조 DNA 100ng을 함께 혼합하여 denature 한 후 denature 시킨 정상인의 증기 염색체 슬라이드 위에 떨어뜨리고 48~72시간 동안 보합반응을 시켰다. 보합반응이 끝나면 세척하여 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)로 대조 염색하여 cooled CCD camera(Photometrics, Tucson, AZ, USA)가 장착된 형광현미경으로 영상을 얻었다. 각 염색체의 FITC와 Texas Red 비는 Quips-XL software (Vysis, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 분석하였으며 10개 이상의 반수체(haploid)에서의 평균값으로

제산하였다. 통상적인 염색체 증폭과 소실의 기준은 diploid 암세포가 50% 존재하는 monosomy나 trisomy에 대한 예상치인 1.25와 0.75를 사용한다.¹⁵⁾ 그러나, 형광이 직접 부착된 dUTP 나 정상 대조 DNA를 사용할 경우 기준의 폭이 좁아질 수 있다. 따라서 대개의 경우 증폭의 기준은 1.10~1.25, 소실의 기준은 0.75~0.90 범위에서 정하여진다.¹⁶⁾ 본 연구에서는 각각 1.2와 0.8 비를 증폭과 소실의 기준으로 하였고 교차된 염색체는 분석에서 제외하

였다.

CGH 분석 결과 1번 염색체 장완부의 일부(q21-q32)가 증폭되어 염색체 핵형 분석 결과와 일치하였다(Fig. 2).

치료 및 경과: 환자는 철결핍성빈혈을 동반한 골수이형성증후군 불응성빈혈로 진단받은 후 철분, 비타민 제제 투여, 그리고 oxymetholon과 prednisolon으로 치료하던 중 상기 증상으로 내원하였으나 폐렴외에 급성 백혈병으로의 전환과 같은 혈액

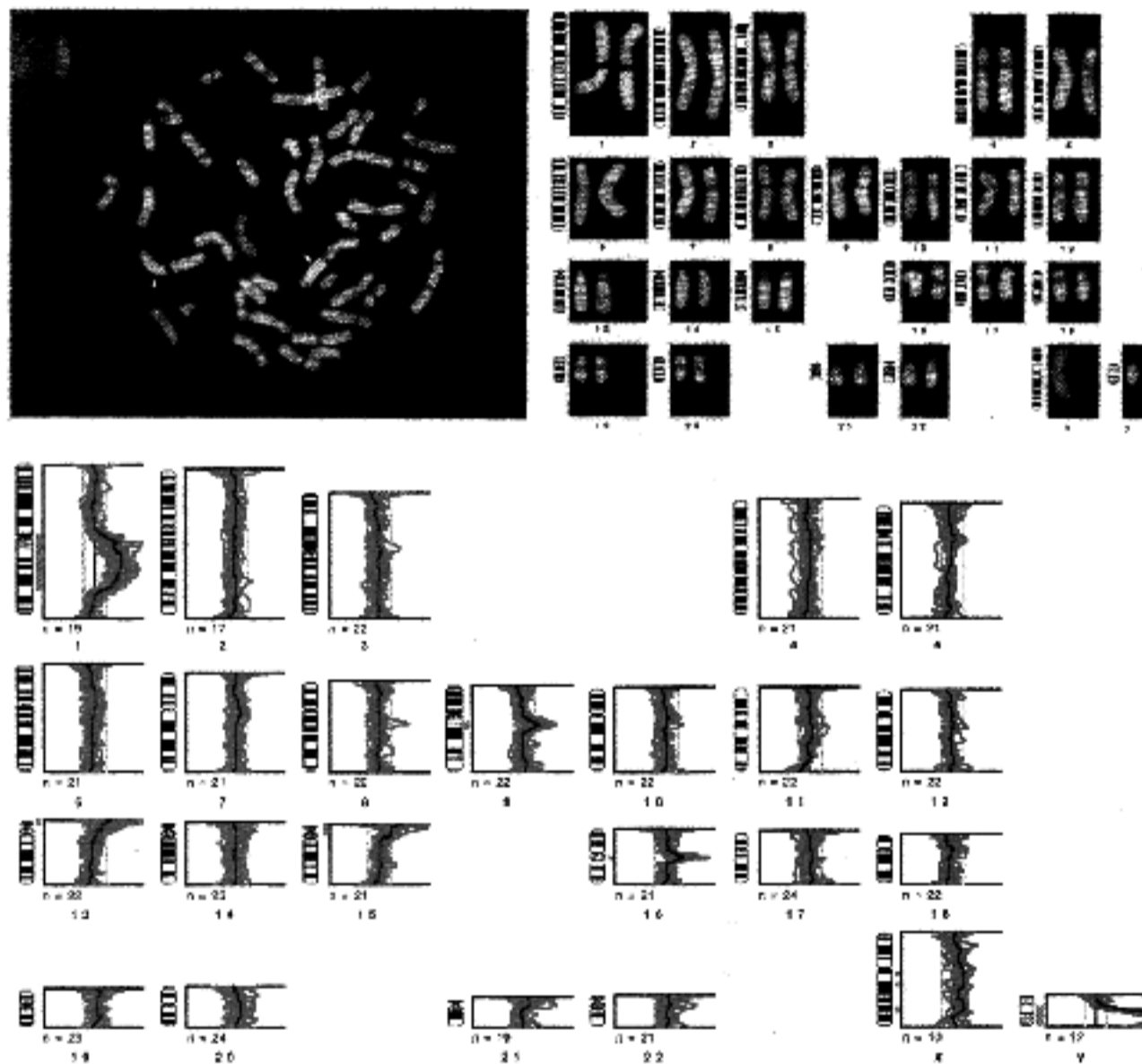


Fig. 2. Computer analysis of CGH images by Quips-XL (Vysis, Inc. USA). Upper left panel shows the metaphase image of both red and green fluorochromes superimposed. A part of long arm of two No. 1 chromosomes (arrows) and Y chromosome appear green in comparison to the overall yellow of the spread. Upper left is automatically converted to the karyotype on the upper right. Overlapped chromosomes are deleted from the analysis. The final ratio profile (lower) is computed as the karyotype is being processed. Values to the left of the black center line indicate deletions, where those to the right indicate amplifications. The thresholds of gain and loss (green and red lines) are 1.2 and 0.8 ratio, respectively. The n is numbers of haploid being analyzed. It can be seen from this profile that amplifications are present in 1q21-1q32.

학적 이상 소견은 발견되지 않았으며 계속 추적 관찰 중이다.

고 찰

골수이형성증후군에서 염색체 이상의 유형에 따른 빈도를 측정하는 것은 아직 보고된 예가 적기 때문에 어렵다.⁴⁻⁷⁾ FAB 분류에 따른 세포 형태와 염색체 이상의 상관성에서는 refractory anemia with excess blast(RAEB)나 refractory anemia with excess blast in transformation(RAEB-t) 아형에서 염색체 이상의 빈도가 chronic myelomonocytic leukemia(CMML)이나 refractory anemia with ring sideroblast(RARS) 아형 보다 높은 것으로 보고되고 있다.⁴⁾ 그렇지만 대부분 염색체 이상은 FAB 분류와 연관된 특이성을 보이지 않는다. 흔히 보고되는 염색체 이상은 5번이나 7번 염색체의 홀염색체나 장완부 결손(-5, -7, del(5q), del(7q)), 8번 염색체의 삼염색체(+8), 17번 염색체 장완부의 등완염색체(i(17q)) 등이 있다.^{4, 7, 9)}

RA 아형에서 염색체 이상의 빈도는 32~85%로 보고자에 따라 매우 다르다. 흔히 보고되는 염색체 이상은 5번 염색체의 장완부 결손(del(5q)), 8번 염색체의 삼염색체(+8), 그리고 7번 염색체의 홀염색체(-7) 등이며 염색체간의 전위는 대부분 1번과 3번 염색체와 연관이 많으며 다른 염색체 이상 보다 적게 보고되고 있다. RARS 아형에서도 염색체 이상의 빈도는 매우 낮으며 흔히 보이는 염색체 이상도 RA 아형과 유사하다.^{6, 7)} RAEB나 RAEB-t 아형에서 염색체 이상은 보고자에 따라 차이가 있으나 RA나 RARS 보다 높은 빈도를 나타낸다. 염색체 이상의 유형도 RA나 RARS에서 보고 되는 것 외에 17번 염색체 장완부의 등완염색체(i(17q)) 등과 같은 복합적인 이상을 보이며 이런 경우 예후와 밀접한 관계가 있다.^{6, 7, 17, 18)}

본 증례에서와 같은 1번 염색체 장완부의 중복과 삼중복 염색체 이상은 RAEB(-t) 그리고 Fanconi 빈혈을 동반한 RAEB로 진단된 예에서 보고된 바 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 그리고 대부분의 예에서 급성골수

성백혈병으로 전환되었다. 중복된 부위는 1번 염색체 장완부의 일부분(1q21-1q44)으로 이곳에는 *SKI* (oncogene), *ARG*(tyrosine-kinase-binding protein), 그리고 *ABL2*(proto-oncogene) 등과 같은 암 유발 인자들이 존재한다. 이러한 유전자가 골수이형성증후군과 어떤 관계가 있는 지는 빈도가 적어 임상적인 의미가 정확히 밝혀지지 않았지만 본 환자의 경우 RAEB(-t)나 급성 골수성 백혈병으로의 전환 여부를 계속 추적 관찰하여야 할 것으로 사료된다.

그리고 본 증례에서 사용한 CGH 기법은 du Manoir 등²²⁾과 Kallioniemi 등²³⁾에 의해 도입되기 시작하여 고행암 등과 같이 전통적 방법으로 중기세포를 얻기 어려운 경우, 정상세포의 오염이 많은 경우, 다양한 클론성 염색체 이상을 보이는 경우, 많은 재배열이 복합적으로 나타나는 경우 등과 같이 분염법으로 분석이 어려운 경우 유용하게 사용될 수 있다. 이 방법은 전 염색체 또는 일부분의 증폭과 소실을 동시에 알 수 있으며, 특히 증폭된 경우 한 개 유전자의 증폭도 검출할 수 있는 반면 소실의 경우는 염색대 이상의 소실이 있어야 검출할 수 있다. 그리고 정상세포와 암세포가 혼합되어 있는 검체를 분석할 때 약 50% 이상에서 염색체 이상을 보일 경우 홀염색체나 삼염색체를 검출할 수 있으며, 유전자의 증폭은 20~30%에서 이상을 보일 경우 검출할 수 있다. 그러나 균형전위나 역위의 경우 검출할 수 없으며, 이배수이상(diploid)과 사배수이상(tetraploid)인 경우 FITC와 Texas red 비의 차이가 없기 때문에 구분이 어려운 단점이 있다. 또한 배경 형광에 의한 간섭이 일어날 수 있는 염색체 말단부(telomere)나 1, 6, 16번 염색체의 중심부와 Y 염색체의 장완부의 이질염색질 부위는 형광강도 비가 매우 다양하게 나타날 수 있어 분석에서 제외하여야 한다.²⁴⁾ 따라서 본 증례에서 보인 9, 13, 15, 16 그리고 Y 염색체의 이질염색질 부위의 증폭은 의미가 없으며, X 염색체의 장완부에 나타난 3개의 작은 증폭은 증폭강도도 약하고 분석된 반수체의 수도 다른 염색체에 비해 적으며 형광의 변이도 심하여 분석에서 제외하여야 할 것으로 사료된다.

CGH 기법은 골수이형성증후군에서처럼 염색체 이상이 숫적 이상이나 염색체의 일부분의 결손을 보이고 균형전위나 역위의 경우가 적게 나타나는 질환에서 염색체 이상을 검출하는데 유용하리라 생각된다.

요 약

골수이형성증후군에서 1번 염색체 장완부 일부가 중복되거나 삼중복된 염색체 이상을 보이는 경우는 드물게 보고되고 있다. 저자들은 골수이형성증후군 환자에서 1번 염색체 장완부 일부에서 중복과 삼중복 염색체 이상을 보인 예가 있어 보고하는 바이다. 환자는 내원 5개월 전에 철결핍성빈혈을 동반한 골수이형성증후군 불응성빈혈로 진단받은 후 철분 및 비타민 제제 투여, 그리고 oxymetholone과 prednisolone으로 치료받아 온 51세 남자 환자가 호흡곤란 증상이 있어 입원하였다. 골수 흡입 검체에서 시행한 염색체 핵형분석 결과 46, XY, dup(1)(q21q32)×2[5]/46, XY, trp(1)(q21q32)[2]/46, XY, dup(1)(q21q32), trp(1)(q21q32)[2]이었으며, 상대적 게놈 보합법(CGH) 분석 결과 1번 염색체 장완부의 일부(q21-q32)가 증폭되어 염색체 핵형분석 결과와 일치하였다. 이 분석에서 검사 DNA와 대조 DNA를 각각 FITC와 Texas Red로 부착하였다. 각 염색체에서 FITC와 Texas Red 비는 Quips-XL software(Vysis, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 분석하였으며 증폭과 소실의 기준은 각각 1.2와 0.8로 하였다.

참 고 문 헌

- 1) Rheingold JJ, Kaufman R, Adelson E, Lear A : *Smoldering acute leukemia. N Engl J Med* 268:812-815, 1963
- 2) Linman JW, Bagby GC : *The preleukemic syndrome(hemopoietic dysplasia). Cancer* 42: 854-864, 1978
- 3) Mufti GJ, Steven JR, Oscier DG, Hamblin

- TJ, Machin D : *Myelodysplastic syndromes: A scoring system with prognostic significance. Br J Haematol* 59:425-433, 1985
- 4) Sole F, Prieto F, Badia L, Woessner S, Florensa L, Caballin MR, Coll MD, Besses C, Sans-Sabrafen J : *Cytogenetic studies in 112 cases of untreated myelodysplastic syndromes. Cancer Genet Cytogenet* 64:12-20, 1992
- 5) *Second International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1979: Chromosomes in preleukemia. Cancer Genet Cytogenet* 2:108-113, 1980
- 6) Knapp RH, Dewald GM, Pierre RV : *Cytogenetic studies in 174 consecutive patients with preleukemic or myelodysplastic syndromes. Mayo Clin Proc* 60:507-516, 1985
- 7) Pierre RV, Catovsky D, Mufti GJ, Swansbury GJ, Mecucci C, Dewald GW, Ruutu T, Van Den Berghe H, Rowley JD, Mitelman F, Reeves BR, Alimena G, Garson OM, Lawler SD, de la Chapelle A : *Clinical-cytogenetic correlations in myelodysplasia(preleukemia). Cancer Genet Cytogenet* 40:149-161, 1989
- 8) Fenaux P, Morel P, Lai JL : *Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. Seminars in Hematology* 33:127-138, 1996
- 9) Horiike S, Taniwaki M, Misawa S, Abe T : *Chromosome abnormalities and karyotypic evolution in 83 patients with myelodysplastic syndrome and predictive value for prognosis. Cancer* 62:1129-1138, 1988
- 10) 이 진, 노임환, 이영열, 김인순, 최일영, 정낙은, 한규섭 : 염색체 이상을 동반한 골수이형성증후군에서 급성골수성 백혈병으로 이행된 1례, *대한혈액학회지* 22:379-392, 1987
- 11) Roulston D, Le Beau MM : *Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases. In Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, eds. The AGT cytogenetics laboratory manual. 3rd ed. Philadelphia. Lippincott-Raven, 1997, pp325-368*

- 12) ISCN : *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Cytogenet Cell Genet Basel : Karger 1995
- 13) du Manoir S, Schrock E, Bentz M, Speicher MR, Joos S, Ried T, Lichter P, Cremer T : *Quantitative analysis of comparative genomic hybridization*. Cytometry 19:27-41, 1995
- 14) Voorter C, Joos S, Bringuier PP, Vallinga M, Poddighe P, Schalken J, du Manoir S, Ramaekers F, Lichter P, Hopman A : *Detection of chromosomal imbalances in transitional cell carcinoma of the bladder by comparative genomic hybridization*. Am J Pathol 146: 1341-1354, 1995
- 15) Speicher MR, Prescher G, du Manoir S, Jauch A, Horsthemke B, Bornfeld N, Becher R, Cremer T : *Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridization*. Cancer Res 54:3817-3823, 1994
- 16) du Manoir S, Kallioniemi OP, Lichter P, Piper J, Benedetti PA, Carothers AD, Fantes JA, Garcia-Sagredo JM, Gerdes T, Giollant M, Hemery B, Isola J, Maahr J, Morrison H, Perry P, Stark M, Sudar D, van Vliet LJ, Verwoerd N, Vrolijk J : *Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization*. Cytometry 19:4-9, 1995
- 17) Weh HJ, Calavrezos A, Seeger D, Kuse R, Hossfeld DK : *Cytogenetic studies in 69 patients with myelodysplastic syndromes(MDS)*. Eur J Haematol 38:166-172, 1987
- 18) Yunis JJ, Lobell ML, Arnesen MA, Oken MM, Mayer MG, Rydell RE, Brunning RD : *Refined chromosomes study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia*. Br J Haematol 68: 189-194, 1988
- 19) Tien H-F, Wang C-H, Chung S-M, Chow J-M, Lee F-Y, Liu M-C, Chen Y-C, Shen M-C, Lin D-T, Lin K-H : *Cytogenetic studies, ras mutation, and clinical characteristics in primary myelodysplastic syndrome, a study on 68 Chinese patients in Taiwan*. Cancer Genet Cytogenet 74:40-49, 1994
- 20) Berger R, Le Coniat M, Schaison G : *Chromosome abnormalities in bone marrow of Fanconi anemia patients*. Cancer Genet Cytogenet 65:47-50, 1993
- 21) Nacheva E, Holloway T, Carter N, Grace C, White N, Green AR : *Characterization of 20q deletions in patients with myeloproliferative disorders or myelodysplastic syndromes*. Cancer Genet Cytogenet 80:87-94, 1995
- 22) du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T : *Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization*. Hum Genet 90:590-610, 1993
- 23) Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D : *Comparative genome hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors*. Science 258:818-821, 1992
- 24) Montgomery KD, Keitges EA, Meyne J : *Molecular cytogenetics : Definitions, clinical aspects, and protocols*. In Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck JL, eds. *The AGT cytogenetics laboratory manual*. 3rd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997, pp557-590.