

Klasickým cytogenetickým vyšetřením v nádorové cytogenetice rozumíme kultivaci nádorových buněk za účelem získání metafázických chromosomů. U hematologických malignit se nejčastěji provádí krátkodobá, 1-3 denní kultivace buněk kostní dřeně, periferní krve, uzliny, sleziny nebo jater. Kultivaci *in vitro* se rozumí kultivace buněk v kultivačním médiu s obsahem řady látek umožňující *in vitro* buněčný růst a dělení. Buňky kostní dřeně mohou být kultivovány bez použitím stimulačních látek, zatím co lymfocyty periferní krve naopak s použitím stimulačních agens proto, že tyto buňky mají *in vitro* nízký mitotický a proliferační potenciál. Příkladem jsou lymfocyty periferní krve chronické lymfocytární leukémie (CLL) nebo plasmocyty mnohočetného myelomu (MM). V roce 2000 Decker *et al.*, využili u CLL nemocných kultivaci buněk v médiu obohaceném s CpG oligodinukleotidy DSP30 a interleukinem 2 (IL-2). Celkem 72 hodin trvající kultivace *in vitro* vedla k zisku metafázických buněk až v 95 % případů a zahájila nové období významu cytogenetického vyšetření u CLL. Další stimulační látkou pro periferní lymfocyty může být phytohemagglutinin (PHA), který se váže především na membránu T buněk a stimuluje buněčné dělení a metabolické aktivity.

Chromosomová analýza představuje 5 základních kroků: 1) založení buněčné kultury, 2) ukončení kultury a sklizení metafázových chromosomů, 3) příprava chromosomových preparátů, 4) pruhování chromosomů a 5) sestavení karyotypu. Objev, že kolchicin (nebo kolcemid) působí jako látka, která zastavuje dělicí se buňky v metafázi a společně s hypotonickým roztokem ovlivňuje počet i kvalitu metafází, se staly základem úspěšného cytogenetického vyšetření. Zpracování vzorku a následné barvení preparátů pro získání cytogenetického výsledku se provádí dle standardních protokolů a je shodné pro všechny typy kultur. Celý proces je složen z hypotonie roztokem 0,75M KCl a následnou fixací směsí metanolu a kyseliny octové v poměru 3:1 opakovaně. Získaná fixovaná směs buněk mléčného zabarvení a požadované hustoty je pak použita na přípravu preparátů kapáním na sklo. Nakapané preparáty jsou barveny různými pruhovacími metodami G-, Q- a R- pruhování, avšak nejčastěji používané je G-pruhování. Jde o tzv. euchromatinové pruhování, při kterém detekujeme pozitivně a negativně zbarvené pruhy lokalizované v euchromatinových oblastech. Vytvoření pruhů se docílí denaturací DNA trypsinem a následným barvením Giemsovým barvivem. Počet pruhů záleží na stupni kondenzace chromosomů a typu buněk, většinou se pohybuje mezi 300-500 pruhy počítáno na haploidní počet chromosomů.

Pro vlastní karyotypování se používá digitalizace, automatické vyhledávání metafází, kdy metafáze na preparátu jsou pomocí softwarového programu a digitální kamery vyhledány, nasnímány a digitální obraz v počítači je pak cílem karyotypování cytogenetika. Sestavení karyotypu se řídí celosvětově platnou nomenklaturou ISCN - International Systems for Cytogenomic Nomenclature. Cytogenetické vyšetření by měli provádět dva nezávislí cytogenetici – analytici, se zkušeností s onkocytogenetikou. Chromosomová analýza poskytuje informaci o všech chromosomových změnách v jedné nádorové buňce na úrovni svého rozlišení.

Cytogenetická analýza je u řady hematologických malignit povinná, jak je uvedeno v evropském doporučení (Tab.1). Tato evropská doporučení navrhuje hodnocení 20 metafází a z nich nejméně u 10 pak sestavení karyotypu. Při hodnocení chromosomových změn je také definován pojem klon, jako nález dvou metafází se stejnou strukturální nebo nadpočetní chromosomovou změnou nebo nález tří a více metafází se ztrátou stejného chromosomu. Za klon je považován i nález pouze jedné metafáze s normálním karyotypem. Klonální změny jsou cílem výsledku cytogenetického vyšetření. Cytogenetické vyšetření se provádí nejen v době diagnózy hematologické malignity, ale také po léčbě, v době remise onemocnění nebo při dalším vývoji onemocnění. I v těchto případech je opět potřeba dodržovat evropská doporučení a hodnotit příslušný počet metafází ve vztahu k nálezu v době diagnózy.

Obr.1: Karyotyp muže 46,XY (G-pruhování, Sekce Nádorové cytogenetiky CMBGT IHOK Brno)



Metody molekulární cytogenetiky

Molekulárně cytogenetické metody jsou založeny na principu hybridizace značených sond s DNA zkoumaného vzorku.

Fluorescenční in situ hybridizace - FISH

Principem metody FISH je cílená hybridizace jednořetězcové sondy značené fluorochrómem ke komplementárním úsekům DNA pacienta. Sondy mohou být lokus specifické (k detekci duplikací, delecí či translokací), centromerické (ke zjištění počtu chromosomů) nebo celochromosomové (pro určení chromosomových přestaveb). Často se používají i různé kombinace těchto sond. Jádra i chromosomy jsou pro vizualizaci ve fluorescenčním mikroskopu podbarvena fluorochrómem DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride).

Celý hybridizační proces začíná tepelnou denaturací preparátu a fluorescenční sondy k vytvoření jednořetězcových úseků DNA. Následná normalizace teplot vede k vytvoření dvouřetězcových úseků DNA na základě komplementarity bazí, kdy dojde k hybridizaci sondy k cílené DNA. Po odmytí nenavázané sondy se pomocí fluorescenčního mikroskopu s příslušnou sadou filtrů hodnotí přítomnost a počet signálů v interfázních jádrech nebo na chromosomech. Právě hodnocení buněk v interfázi je obrovskou výhodou této metody oproti klasické cytogenetice, protože odpadá nutnost nalezení metafází. Standardně se hodnotí u každého pacienta 200 interfázních jader a citlivost metody je závislá na velikosti sondy pokrývající chromosomový úsek nebo gen.

Interfázní FISH může být použita jako samostatná diagnostická metoda pro některé diagnózy je povinná nebo doporučena pro jiné hematologické malignity, jak ukazují tabulky (Tab.1, 2)

Mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace (mFISH) a mnohobarevné pruhování (mBAND)

Dalším pokrokem v metodě FISH bylo zavedení metody mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (mFISH). Princip metody je shodný s klasickou metodou FISH, přičemž hybridizace je prováděna se směsí celochromosomových sond, které odpovídají každému chromosomu v karyotypu. Sondy pro každý chromosom jsou připraveny kombinací 5 různých fluorochromů a základem je výpočet kombinací barev $2^N - 1$, tedy kombinace 5ti barev pokrývá 22 autosomů a 2 gonosomy. Pro snadnější hodnocení a rozlišení kombinací barev jednotlivých chromosomů je karyotyp pomocí speciálním softwaru hodnocen přiřazením jednotlivým kombinacím pseudobarvy. mFISH analyzuje celý lidský genom v jednom vyšetření. Metodou

mFISH dokážeme identifikovat balancované i nebalancované translokace a především přesně určit komplexní přestavby chromosomů a komplexní karyotyp i přítomné marker chromosomy.

Další variantou metody FISH je metoda **mBAND**, využívající sond opět značených kombinací fluorochromů. Jedná se o určitou formu modifikace metody mFISH, kdy se na jednotlivé části každého chromosomu hybridizují různě označené úseky daného chromosomu tvořící sondu pro daný chromosom. Po nasnímání a zobrazení v softwaru lze pak na základě nasnímaných intenzit fluorochromů podél chromosomu a mapy značení jednotlivých částí chromosomu, určit strukturní změny daného chromosomu. Mnohobarevné pruhování lze využít pro rozlišení intrachromosomových přestaveb, zejména pro lokalizaci místa zlomu.

ArrayCGH-array komparativní genomová hybridizace

K překonání některých limitací klasické cytogenetiky a metod FISH je možné použít čipové technologie, které určují změny v počtu kopií (CNA) a mohou určit získané ztráty heterozygoty (aCN-LOH). Metoda arrayCGH je molekulárně cytogenetická metoda, založená na kompetitivní hybridizaci normální a nádorové DNA k DNA cílům, kterými jsou fragmenty genomické DNA nebo oligonukleotidy umístěné na hybridizačním skle, které označujeme microarray nebo čip.

Jednou z základních podmínek úspěšné hybridizace je získání velmi kvalitní normální a nádorové DNA. Následně jsou fragmenty genomické a normální DNA značeny rozdílnými fluorochromy, denaturovány a následně hybridizovány k fragmentům DNA na hybridizačním skle-čipu. Výsledek hybridizace jednořetězcových, rozdílně fluorescenčně označených fragmentů genomické a nádorové DNA je hodnocen na základě měření intenzity při hybridizované DNA k fragmentům na čipu. Poměr obou naměřených intenzit je porovnán a podle stanovených hranic naměřených intenzit pak určujeme oblasti se ztrátou genetického materiálu nebo naopak se získáním genetického materiálu. SNPs array jsou další variantou celogenomových čipových metod, využívající jednonukleotidové polymorfismy v lidském genomu a čip pak obsahuje oligonukleotidy příslušných alel. Výsledek je shodný s metodou arrayCGH, dovoluje určení jak CNA, tak aCN-LOH a je citlivější pro určení hyperploidií.

Cytogenetika vybraných hematologických malignit.

Hematologické maligní onemocnění jsou definována spektrem genetických změn, některé z nich jsou specifické a nenáhodné a mají diagnostický a nebo prognostický význam. Výběr metod pro určení specifických, nenáhodných ale i náhodných aberací u vybraného hematologického onemocnění souvisí s potvrzeným klinickým významem a poznatky o patogenezi onemocnění. Cytogenetická vyšetření se provádějí jak v době diagnózy, tak v průběhu onemocnění. Důležité je si uvědomit, že zatím neexistuje metoda, která by odpověděla na všechny genetické otázky a odhalila všechny genetické změny a proto je vhodné kombinovat různé metody k získání optimálních výsledků.

Příkladem je vyšetřování nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML) a určení první specifické chromosomové změny u nádorů člověka, Filadelfského chromosomu (Ph). Ten je výsledkem reciproké translokace mezi chromosomy 9 a 22, $t(9;22)(q34;q11)$. Tato změna je přítomná u 90-95% nemocných v době diagnózy CML. Ostatní nemocní (5-10%) mají variantní translokaci nebo kryptickou přestavbu, která vede k fúzi genů BCR/ABL1. Potvrzením diagnózy CML je tedy přítomnost fúzního genu určeného metodou FISH nebo RT-PCR. Cytogenetické vyšetření je přesto podle evropského doporučení povinné, protože již v době diagnózy 10-15% nemocných má přídatné chromosomové změny v Ph pozitivním klonu a jejich určení je významné, protože může odhalit nemocné v pokročilé fázi onemocnění jako je

akcelerovaná fáze CML, tedy může být známkou nepříznivé prognosy. V současném doporučení ELN (Evropská leukemická síť) je cytogenetické vyšetření v době diagnózy povinné a doporučený počet analyzovaných metafází je 20 právě z důvodů možného odhalení přídatných chromosomových změn. Metoda FISH je povinná v případech neúspěšného cytogenetického vyšetření nebo nedostatečného počtu metafází nebo v případě nálezů normálního karyotypu s podezřením na kryptickou přestavbu. Cytogenetika je rovněž povinná při monitorování odpovědi na léčbu v období po 3, 6 a 12 měsících léčby a to až do dosažení kompletní cytogenetické odpovědi, tedy nenalezení žádné metafáze s Ph chromosomem mezi 20 hodnocenými metafázemi. Další monitorování odpovědi je stanovováno molekulárně geneticky hladinou BCR/ABL1 transkriptu.

U akutní myeloidní leukémie (AML) jsou diagnostické podskupiny AML definovány na základě nálezů specifických chromosomových změn nebo genových mutací. Cytogenetické vyšetření je v diagnóze povinné a má prognostický význam. Stejně tak je povinné molekulárně genetické vyšetření rekurentních mutací. Metodou FISH je doporučeno vyšetření přestavby genu MECOM a KMT2A. Ostatní fúzní geny je možné stanovit metodou FISH, ale jsou stanovovány z důvodů využití pro sledování minimální residuální nemoci (MRN) metodami molekulární genetiky.

Akutní lymfoblastická leukémie (ALL) je také charakterizována rekurentními aberacemi prognostického významu. K nejvýznamnějším patří nález Ph chromosomu, translokace t(9;22)(q34;q11) s fúzí genů BCR/ABL1, přestavby genu KMT2A a u dětských ALL nález hyperdiploidie a translokace t(12;21)(p13;q22). Doporučení pro analýzy fúzních genů u ALL jsou také součástí evropských doporučení.

Nenáhodné chromosomové změny především prognostického významu můžeme pozorovat i u různých typů myeloproliferativních onemocnění a myelodysplastického syndromu a doporučení jejich vyšetření je uvedeno v tabulce č.2.

Chronická lymfatická leukémie (CLL) je nejčastějším onemocněním vyššího věku v západním světě. Rekurentní chromosomové změny mají potvrzený prognostický význam a jsou určovány metodou FISH, jak doporučuje IWCLL guidelines (Mezinárodní workshop CLL). Prognosticky nepříznivou podskupinou jsou nemocní s nálezem delece chromosomu 11q, 17p a komplexního karyotypu. Pro určení komplexního karyotypu využíváme klasické cytogenetické vyšetření doplněné metodou mFISH.

Stejná doporučení platí i pro užití metody FISH pro prognostickou stratifikaci nemocných s mnohočetným myelomem. S nepříznivým prognostickým významem je spojena translokace t(4;14), t(14;16) a delece TP53.

Poslední velkou skupinou hematologických malignit, kde určení chromosomových změn má prognostický význam jsou ne Hodgkinské lymfomy (NHL). K nejčastějším rekurentním aberacím patří translokace t(11;14) u lymfomu z pláštěvých buněk (MCL), t(14;18) u folikulárního lymfomu (FL), t(8;14) u Burkitt lymfomu (BL) nebo translokace zahrnující gen ALK u difúzních velkobuněčných lymfomů (DLBCL). Všechna tato doporučení shrnuje tabulka č. 2.

Cytogenetika a její metody zůstávají i v éře celogenomového a exomového sekvenování stále nedílnou součástí diagnostických a prognostických metod.

Tabulka č.1: Přehled povinně prováděných metod u hematologických malignit (Upraveno podle Evropských doporučení; Rack et al, 2019)

Typ onemocnění	Metoda	Literatura
CML	Karyotyp FISH: BCR/ABL1	Baccarani et al, 2013,2015 Hochhaus et al.2020
MDS	Karyotyp FISH: -5/5q-, -7/7q-, MECOM, +8, 20q-, delTP53	Malcovati et al, 2013
AML	Karyotyp FISH: PML/RARA, CBFβ/MYH11, RUNX1/RUNX1T, KMT2A, MECOM	Dohner et al, 2017
ALL	Karyotyp FISH: fúzní geny (specifikováno v Tab.2)	Hoelzer et al, 2016 Harrison et al, 2010

CML-chronická myeloidní leukémie; MDS-myelodysplastický syndrom; AML-akutní myeloidní leukémie; ALL-akutní lymfoblastická leukémie

Tabulka č.2: Přehled cytogenetických vyšetření u hematologických malignit (upraveno podle Rack et al, 2019)

Typ onemocnění	Metoda		arrayCGH /SNP array	Literatura
	Cytogenetika	FISH		
CML	Karyotyp	BCR/ABL1	NE	Hochhaus et al, 2020
Myeloidní/lymfoidní neoplázie s eosinofilií	Karyotyp	PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, PCM1/JAK2	NE*	Butt et al, 2017
MDS	Karyotyp	del(5q)/-5, del(7q)/-7, MECOM, +8, del(20q), del(17p)/TP53	ANO	Schanz et al, 2012 ; Xu et al, 2013
AML	Karyotyp	KMT2A, MECOM, +8, fúzní geny: PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T	NE*	Dohner et al, 2017 Papaemmanuil, E. et al. 2016
B-ALL dospělí	Karyotyp	KMT2A, BCR/ABL1, TCF3, CRLF2	ANO	Moorman, 2010 Schwab&Harrison 2018
B-ALL děti	Karyotyp	KMT2A, ETV6/RUNX1, BCR/ABL1, TCF3 CEP sondy-hyperdiploidie	ANO	Moorman, 2010 Tasian et al, 2017, Liu et al, 2016
T-ALL děti/dospělí	Karyotyp	TLX3, TLX1, KMT2A, TAL1, LMO1, ABL1	NE	Mrózek et al, 2009
CLL	Karyotyp	delece 13q, ATM, TP53, trisomie 12	ANO	Hallek et al, 2018 Schweighofer et al, 2013
MM		t(4;14), t(14;16), delece TP53, zisk 1q/del(1p), t(11;14), t(14;20), CEP sondy-ploidie	ANO	Sonneveld et al, 2016 Avet-Loiseau H et al, 2009
Jiné B buněčné malignity (B-NHL, BL)	Karyotyp	IGH, CCND1, MYC, BCL2, ALK, BCL6, NMYC	ANO	Swerdlow et al, 2016; Armitage et al, 2017; Tirado et al, 2012

CML-chronická myeloidní leukémie; MDS- myelodysplastický syndrom; AML-akutní myeloidní leukémie; B-ALL-B-buněčná akutní lymfoblastická leukémie; T-ALL-T-buněčná akutní lymfoblastická leukémie; CLL-chronická lymfocytární leukémie; MM-mnohočetný myelom; B-NHL-nehodkinský lymfo; BL-Burkittův lymfom;
NE*-vyšetření může být provedeno v případě nálezu komplexního karyotypu
CEP-centromerické sondy

Literatura:

Avet-Loiseau H, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 27(27): 4585-4590, 2009

Armitage, J. O, et al. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 390, 298-310,doi:10.1016/S0140-6736(16)32407-2 (2017).

Baccarani M, et al. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol.* 2015;

Butt NM, et al. Guideline for the investigation and management of eosinophilia. *Br J Haematol.* 2017;176:553–72.

Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, et al. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol* 2000;28:558-568

European Leukaemia Network http://www.leukemia-net.org/content/home/index_eng.html

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120:2454–65.

Gong JZ, Cook JR, Greiner TC, Hedvat C, Hill CE, Lim MS, et al. Laboratory practice guidelines for detecting and reporting JAK2 and MPL mutations in myeloproliferative neoplasms: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2013;15:733–44

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in AML: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities amongst 5635 younger adults treated in the UK MRC trials. *Blood.* 2010;116:354–65.

Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood.* 2018;131:2745–60.

Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. *Blood* 2010;27: 94(Suppl 2):S141–7.

Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020; <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>.

Chudoba I, Hickmann G, Friedrich T et al. mBAND: a high resolution multicolor banding technique for the detection of complex intrachromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res.*2004;104:390-3.

Ijssel P, Ylstra B. Oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Methods Mol Biol* 2007;396:207-21.

Liu BY, Wang WN, Zhang JY, et al. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia *EBioMedicine* 8 (2016) 173–183.

Lucito, R., *et al.* Representational oligonucleotide microarray analysis: A high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Research* 13, 2291–2305 (2003)

Malcovati L, Hellström-Lindberg E, Bowen D, Adès L, Cermak J, del Cañizo C, et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet. *Blood*. 2013;122:2943–64.

McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M (eds) (2016) An international system for human cytogenomic nomenclature. S. Karger, Basel.

Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* 2012;26:123–35.

Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematol* 2016; 101(4):407-16.

Mrozek K et al. Cytogenetics and Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009; 23(5): 991-1008.

Papaemmanuil, E. et al. Genomic classification and prognosis in acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374, 2209–2221 (2016).

Parker A, Bain B, Devereux S, Gatter K, Jack A, Matutes E, et al. Best practice in lymphoma diagnosis and reporting. 2008. www.rcpath.org

Rack AK, van den Berg E, Haferlach C, et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 2019; 33:1851–1867.

Schanz J, Tüchler H, Solé F, Mallo M, Luño E, Cervera J, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. *J Clin Oncol.* 2012;30:820–9.

Schwab C, Harrison C. Advances in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Genomics. *Hemasphere* 2018; 2:p e53.

Schweighofer CD, Coombes KR, Majewski T, Barron LL, Lerner S, Sargent RL, et al. Genomic variation by whole-genome SNP mapping arrays predicts time-to-event outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: a comparison of CLL and Hap-Map genotypes. *J Mol Diagn.* 2013;15:196–209.

Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 1996;12:368–375.

Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usami S, Siegel D, Anderson KC, et al. Treatment of multiple myeloma with high risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood.* 2016;127:2955–62.

Swerdlow, S. H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; 127:2375-2390

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.

Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome–like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130:2064–72.

Tirado CA, Cen W, Garcia R, et al. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large b-cell lymphoma: a review of the literature. *J Hematol Oncol* 2012;5:54-66.

Xu, X., Johnson, E.B., Levertson, L., Arthur, A., Watson, Q., Chang, F.L., Raca, G. & Laffin, J.J. (2013) The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies—a comparative study of three genetic testing methods. *Cancer Genetics*, 206, 317–326.