

Molekularna kariotipizacija – nov pristup u kliničkoj i laboratorijskoj genetici

Molecular karyotyping – a new approach in clinical and laboratory genetics

Luca Lovrečić*, Irena Vrečar, Borut Peterlin

Sažetak. Metoda molekularne kariotipizacije omogućava analizu genomskih mutacija s visokom rezolucijom na razini cijelog humanog genoma. Manje genomske mutacije (mikrodelecije, mikroduplicacije) koje nije moguće otkriti klasičnom kariotipizacijom prisutne su u čak 15 % pacijenata s mogućom dijagnozom genetičkog poremećaja. Molekularna kariotipizacija je u određenim kliničkim slučajevima već u potpunosti zamijenila klasičnu kariotipizaciju i primjenjuje se u prenatalnoj i postnatalnoj genetičkoj dijagnostici.

Ključne riječi: komparativna genomska hibridizacija s mikromrežama; mikrodelecija; prenatalna genetska dijagnostika; zaostajanje u razvoju

Abstract. Molecular karyotyping enables the analysis of the entire human genome on high resolution scale. Smaller genomic mutations (microdeletions, microduplications) that are not detectable using conventional G-banded karyotyping, are present in about 15 % of patients with suspected genetic disease. In certain clinical settings molecular karyotyping has already replaced classical karyotype analysis and is used in postnatal as well as in prenatal genetic diagnosis.

Key words: array based comparative genomic hybridization; developmental delay; microdeletions; prenatal genetic diagnosis

Klinički institut za medicinsku genetiku,
Klinika za ginekologiju i porodništvo,
Univerzitetni medicinski centar Ljubljana,
Ljubljana, Slovenija

Primljeno: 4. 2. 2014.
Prihvaćeno: 20. 2. 2014.

***Dopisni autor:**

Doc. dr. sc. Luca Lovrečić, dr. med.
Klinički institut za medicinsku genetiku,
Klinika za ginekologiju i porodništvo,
Univerzitetni medicinski centar Ljubljana
Slajmerjeva 3, 1 000 Ljubljana, Slovenija
e-mail: lucalovrecic@gmail.com

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

UVOD – RAZVOJ I METODA

Metoda molekularne kariotipizacije omogućava analizu cijelog genoma pacijenta odjednom s visokom rezolucijom i tako sve češće zamjenjuje klasičnu kariotipizaciju. Otkrivanje kromosomskih preuređenja, tijekom više od 35 godina temeljilo se na metodama klasične citogenetike i G-oprugavanja kromosoma. Glavno ograničenje klasične citogenetske metode je rezolucija, koja i u najboljim laboratorijima nije veća od 3 do 5

Molekularna kariotipizacija primjenjuje se u svim područjima kliničke genetike, uključujući postnatalne slučajeve, prenatalnu genetičku dijagnostiku te sve češće preimplantacijsku genetičku dijagnostiku. Postala je glavna dijagnostička metoda pomoću koje se otkrivaju genomske mutacije u pacijenata s idiopatskom mentalnom retardacijom, zaostajanjem u razvoju, dismorfnim znakovima i prirođenim razvojnim anomalijama.

megabaza (Mb), a najčešće iznosi između 5 i 10 Mb, čime je onemogućeno otkrivanje manjih mikrodelecija/mikroduplicacija. S druge strane, takve manje mikrodelecije i mikroduplicacije uzrok su kliničkih poremećaja u otprilike 15 % pacijenata sa sumnjom na gensku ili kromosomsku aberaciju¹. Dodatna ograničenja kariotipizacije su subjektivna procjena kromosomskih preuređenja i značajna varijabilnost u sposobnosti njihova otkrivanja između različitih laboratorija. Metoda komparativne genomske hibridizacije na kromosomima razvijena je s ciljem povećanja rezolucije i uspješno se koristila za analizu kromosomskih preraspodjela u solidnim tumorima već od 1992. godine². Metoda se temelji na fluorescentnom označavanju ispitivanog i referentnog DNK-a označenog različitim bojama, koje se potom istovremeno hibridizira na unaprijed pripremljene normalne kromosomske preparate. Razlike u hibridizaciji ispitivanog i referentnog DNK-a uočavaju se kao razlike intenziteta boja, što je osnova za procjenu prisutnosti kromosomskih preuređenja. Kako bi se dodatno povećala rezolucija, krajem devedesetih godina razvila se komparativna genomska hibridizacija s upotrebom mikromreža ili molekularna karioti-

pizacija) (engl. *array-based comparative genomic hybridization*; aCGH). Iako su prvotno korišteni BAC klonovi (engl. *bacterial artificial chromosome*)³, kasnije su ih zamijenile mikromreže s oligonukleotidima, koje se sastoje od umjetno sintetiziranih kratkih specifičnih sljedova nukleotida, koji su jedinstvenog redoslijeda u genomu i predstavljaju specifičan odsječak humanog genoma. Time rezolucija mikromreže ovisi samo o tome koliko su blizu smješteni ti odabrani kratki jedinstveni sljedovi kroz cijeli genom. Trenutno dostupne komercijalne mikromreže nude rezoluciju od 1000 – 2000 bp.

S obzirom na sve veću upotrebu metode tijekom posljednjih godina, raste i broj razjašnjenih slučajeva zaostajanja u razvoju i prirođenih razvojnih anomalija, a otkrivaju se i novi sindromi, poput nedavno opisanih 5q31.3⁴ i 13q12.3 mikrodelecijskih sindroma⁵.

PREDNOSTI I OGRANIČENJA METODE

Metoda molekularne kariotipizacije, aCGH, u usporedbi s klasičnom kariotipizacijom ima bolju rezoluciju, daje veću sigurnost pri interpretaciji rezultata (subjektivnost očitavanja nije moguća), omogućava kraće vrijeme do rezultata, ne zahtijeva da su stanice u fazi diobe, koristi manje osnovnog radnog materijala i omogućava automatizaciju cijelog postupka. U usporedbi s FISH metodom (engl. *fluorescence in situ hybridization*), prednosti aCGH metode su mogućnost analize cijelog genoma odjednom i sposobnost otkrivanja duplikacija s većom osjetljivošću⁶.

Glavno ograničenje metode je nemogućnost otkrivanja balansiranih kromosomskih preuređenja (translokacije i inverzije), koja mogu biti patološka ako se lom dogodio na mjestu gena ili regulatorne regije, te koja mogu biti problematična pri segregaciji kromosoma tijekom stvaranja jajnih stanica i spermija, često uzrokujući spontane pobačaje.

Drugo ograničenje metode aCGH je mogućnost otkrivanja varijacija broja kopija (engl. *copy number variation*; CNV) nepoznatog značenja (engl. *variant of unknown significance*; VUS). Takvi nalazi su izazov prilikom interpretacije rezultata. Naime, većina otkrivenih CNV-ova su benigne varijacije i prisutne su u normalnoj populaciji, dok su

neke patološke. Prilikom interpretacije rezultata važan korak čini pregled svih postojećih baza podataka, u kojima se redovito skupljaju novi primjeri, kao što su DECIPHER⁷, ECARUCA⁸, ICGG⁹ i DGV¹⁰.

EPIDEMIOLOGIJA GENOMSKIH MUTACIJA

Primjenom nove metode aCGH genomske mutacije (delecije i duplikacije) postale su potpuno novo područje kliničke genetike. Genomske mutacije čine prijelaz između genskih i kromosomskih mutacija. Tek je uvođenjem metode aCGH postalo jasno kolika je učestalost genomske mutacije te kakav udio čine patološke, benigne i mutacije s nejasnim značenjem. U jednom istraživanju analizom 1.000 genoma otkriveno je više od 14.000 većih delecija¹¹, dok je, usporedivo, druga skupina istraživača otkrila više od 11.000 strukturnih varijacija analizom 800 genoma¹², čime je pokazano da su to česta genomska preuređenja.

PRIMJENA MOLEKULARNE KARIOTIPIZACIJE U KLINIČKOJ PRAKSI

Molekularna kariotipizacija primjenjuje se u svim područjima kliničke genetike, uključujući postnatalne slučajeve, prenatalnu genetičku dijagnostiku, te sve češće preimplantacijsku genetičku dijagnostiku. Metoda u navedenim područjima već uspješno nadopunjuje klasičnu kariotipizaciju, a sve više i potpuno zamjenjuje te metode.

Postnatalna dijagnostika

Molekularna kariotipizacija je glavna dijagnostička metoda pomoću koje se otkrivaju genomske mutacije u pacijenata s idiopatskom mentalnom retardacijom, zaostajanjem u razvoju, dismorfnim znakovima i prirođenim razvojnim anomalijama^{6,13-15}. Odnedavno su značajne indikacije i određeni tipovi epilepsije i stanja spektra autističkih poremećaja^{16,17}. U jednom istraživanju je pomoću metode molekularne kariotipizacija analizirana velika skupina od 21.000 pacijenata sa zaostajanjem u razvoju, mentalnom retardacijom, prirođenim razvojnim anomalijama i poremećajima autističnog spektra. U tom je istraživanju utvrđena uzročna genomska mutacija (mikrodelecija ili mikroduplikacija) u 15 – 20 % slučajeva^{14,18}. Za usporedbu, klasičnom kariotipizacijom

uspješno bi bila otkrivena kromosomopatija u svega 2 do 3 % pacijenata. Prepoznatljivi kromosomski poremećaji, kao što je Down sindrom, bili su isključeni iz ovog istraživanja. Nadalje, u drugom istraživanju je provedena retrospektivna analiza nalaza svih pacijenata upućenih na citogenetičku dijagnostiku u razdoblju od 1996. do 2005. godine, njih više od 36.000. Utvrđeno je da upotrebom molekularne kariotipizacije ne bi bilo moguće otkriti kromosomska preuređenja u svega 0,78 % svih upućenih pacijenata¹⁵.

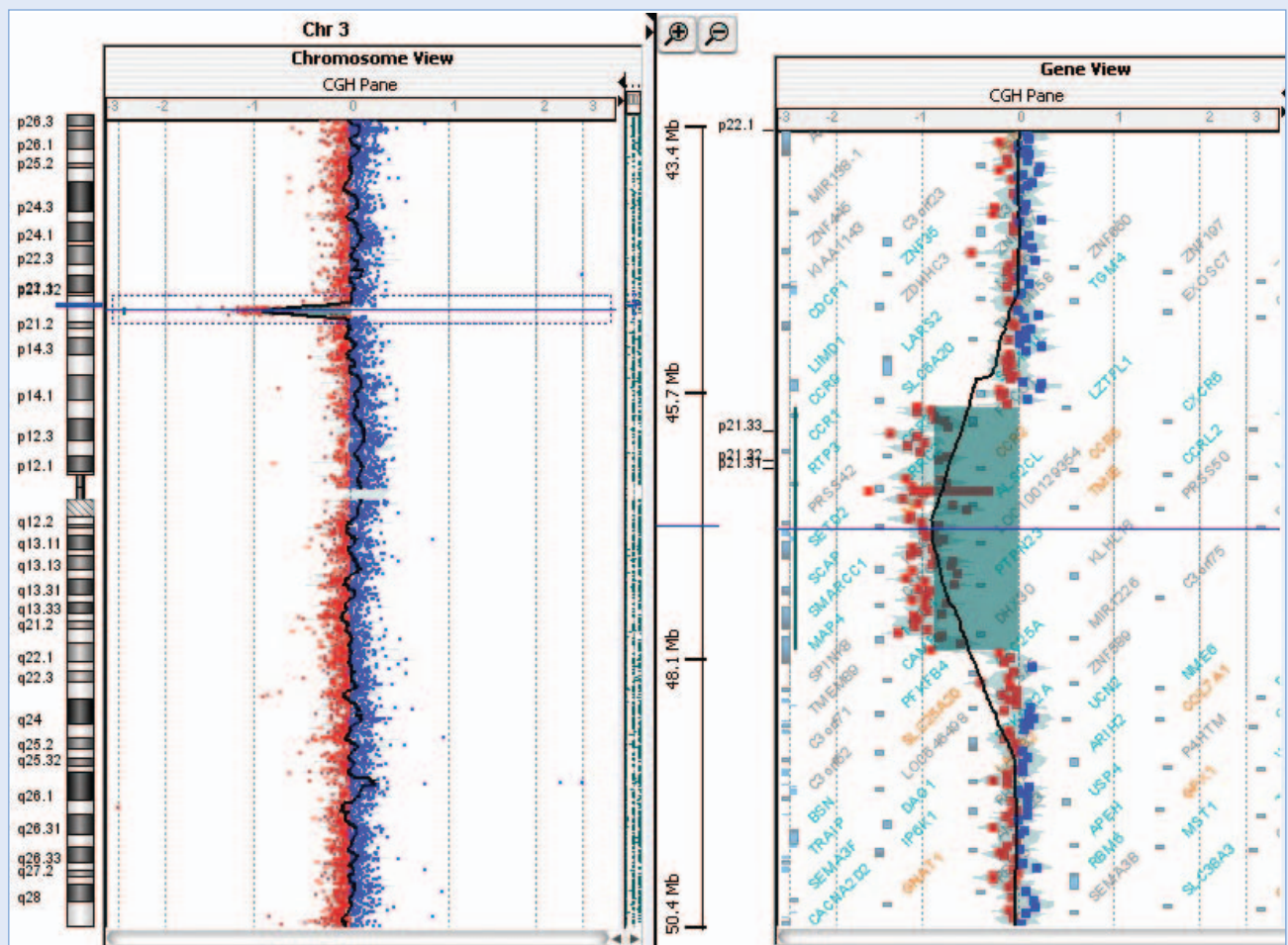
Osim što je rezultat neusporedivo bolji, molekularnom kariotipizacijom moguće je otkriti i nove, nepoznate mikrodelecijske i mikroduplikacijske sindrome, kao i nove gene uključene u patogenezu prethodno opisanih kliničkih sindroma.

Klinički slučaj 1

U ambulanti Kliničkog instituta za medicinsku genetiku (UKC Ljubljana) pregledan je šestogodišnji dječak s općim zaostajanjem u razvoju, dismorfnim znakovima lica (izduženo lice, koso položeni očni rasporci usmjereni prema dolje, udubljeni filtrum, nisko postavljene uši neobičnog oblika), hipotonijom, displastičnim desnim bubregom, pijeloureteralnom stenozom, hidronefrozom i hipotireozom. Obiteljska anamneza bila je uredna. Nalaz klasične kariotipizacije i subtelomernog FISH-a bili su uredni. Molekularnom kariotipizacijom utvrđena je mikrodelecija područja 3p21.31 (arr[hg19] 3p21.31(45,881,062-48,009,576)x1 dn), veličine 2,13Mb ± 0,01 Mb (slika 1). U tom području nalazi se više od 30 poznatih gena indeksiranih u bazi podataka RefSeq. Zasad nema opisa istog slučaja u literaturi, a pregledom svih baza utvrdili smo da su dosad opisana samo dva slična slučaja. Opisana mikrodelecija najvjerojatnije je uzrok kliničke slike u dječaka, te čini novu spoznaju u razumijevanju genetičke etiologije kliničke slike u tog djeteta.

Prenatalna genetička dijagnostika

U prenatalnoj genetičkoj dijagnostici metode klasične kariotipizacije, FISH i kvantitativna fluorescentna lančana reakcija polimerazom (QF-PCR) trenutno su metode izbora za otkrivanje kromosomopatija. Molekularna kariotipizacija svakako je indicirana u slučajevima ultrazvučno utvrđenih struk-



Slika 1. Delecija 3p21.31 otkrivena molekularnom kariotipizacijom.

Slika prikazuje rezultat aCGH. Lijevo je prikazan cijeli kromosom 3. Crna crta prikazuje prosječne vrijednosti razlike intenziteta među ispitivanim i referentnim DNK-om i crta se nalazi vertikalno u jednoj liniji. U odsjeku 3p21.31 prosjek vrijednosti se značajno pomakne ulijevo, što predstavlja deleciju. Desna slika prikazuje samo dio kromosoma 3, gdje je prisutna delecija. Crvene i plave točke predstavljaju razlike u intenzitetu među ispitivanim i referentnim DNK-om za svaki oligonukleotid posebno.

Interpretacija rezultata molekularne kariotipizacije predstavlja izazov, pogotovo u slučajevima otkrivanja VUS-a i genomske mutacije koje prethodno nisu bile opisane, kao i u slučajevima kada su genomske mutacije prisutne u pacijenta i jednog od roditelja (pojam varijabilne penetrabilnosti). Zbog mogućnosti pronalaska VUS-a posebno je važno provesti genetičko savjetovanje prije i poslije testa.

turnih anomalija ploda, uključujući poremećaje u razvoju srca, dijafragmalnu herniju, poremećaje u razvoju središnjeg živčanog sustava, te posebice kad je zahvaćeno više organskih sustava¹⁹. Analizom više od 5.000 prenatalnih uzoraka pokazano je da je u skupini plodova s ultrazvučno utvrđenim

anomalijama moguće otkriti uzročnu genomske mutaciju u 6,5 % slučajeva, od kojih se većina, čak 71 %, ne bi mogla utvrditi klasičnom kariotipizacijom²⁰. U prenatalnoj dijagnostici je molekularnom kariotipizacijom potrebno pratiti još jednu skupinu pacijenata, koja uključuje osobe kojima je klasičnom kariotipizacijom otkrivena balansirana translokacija *de novo* ili marker kromosom *de novo*¹⁹. Prema podacima objavljenih istraživanja u skupini pacijenata s prirođenim razvojnim anomalijama u kojih je klasična kariotipizacija otkrila balansiranu translokaciju, čak u 40 % slučajeva otkrivena su manja kromosomska preuređenja^{21,22}.

Svakako je jasno da je i u prenatalnoj genetičkoj dijagnostici rezultat metode molekularne kariotipizacije neusporedivo bolji, no potrebno je naglasiti značajan izazov. Naime, metoda često otkrije

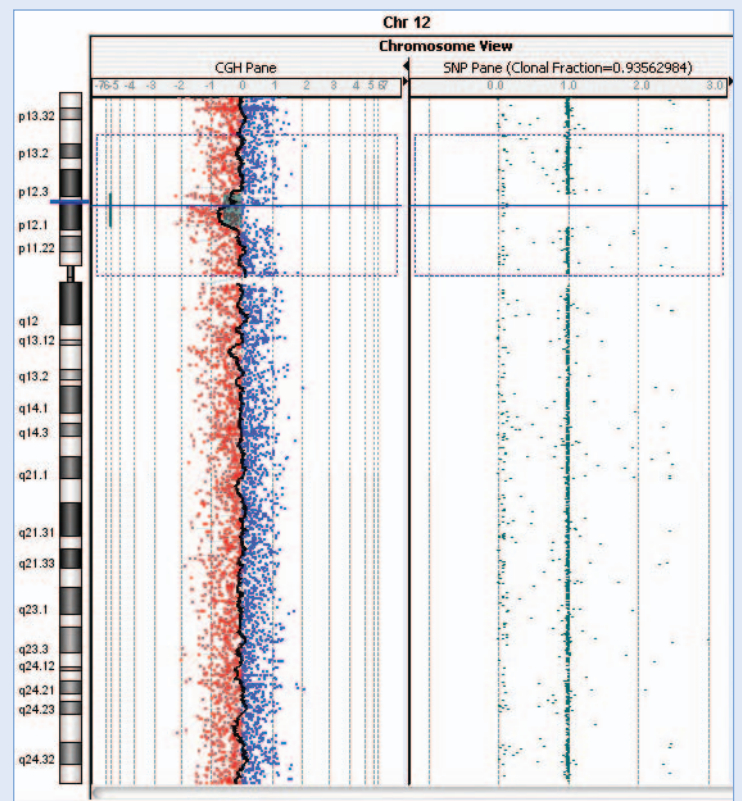
genomske VUS promjene (engl. *variant of unknown significance*). U takvim slučajevima testiraju se i roditelji kako bi se utvrdilo je li VUS koji je otkriven u ploda prisutan u jednog od roditelja. U slučaju kada je roditelj nositelj iste genomske varijacije i kada nema nikakvih kliničkih simptoma može se zaključiti da je utvrđena genomska promjena najvjerojatnije benignog značenja. Analiza roditelja potrebna je u približno 20 % slučajeva¹⁹. Istraživanje provedeno na više od 300 prenatalnih slučajeva pokazalo je da je nakon analize roditelja ostalo približno 1 % nerazjašnjenih slučajeva²³.

Klinički slučaj 2

Radi povećanog nualnog nabora bila je napravljena amniocenteza i kariotipizacija koja je pokazala naizgled balansiranu kompleksnu translokaciju u ploda: 46,XY,t(7;8;12)(q34;q21.1;q12)dn. Metodom aCGH otkrivena je intersticijska delecija područja 12p11.2 ((arr[hg19] 12p12.1(21,356,582-25,062,714)x1 dn), veličine $3,70 \pm 0,01$ Mb (slika 2). U tom području nalazi se trenutno 13 poznatih gena. U literaturi je dosad opisano nekoliko slučajeva s delecijama koje su uključivale i opisanu regiju. U tim slučajevima bilo je prisutno zaostajanje u razvoju, dismorfni znakovi i strukturne anomalije srca²⁴. Ultrazvuk srca u našem primjeru bio je urednog nalaza.

Klinički slučaj 2 jasno prikazuje kako je kod kompleksnih translokacija moguća uključenost i drugih područja genoma, a ne samo točaka loma, što je od uvođenja aCGH metode opisano i u nekoliko znanstvenih publikacija²⁵.

Osim u klasičnoj prenatalnoj dijagnostici, primjena aCGH metode moguća je i u preimplantacijskoj genetičkoj dijagnostici (PGD)²⁶. Preimplantacijska genetička dijagnostika primjenjuje se u parova s visokim rizikom za prijenos kromosomske ili genske mutacije na zametak i uključuje postupak umjetne oplodnje. Indikaciju u više od tri četvrtine (76 %) PGD postupaka u Europi i Sloveniji čine strukturna i brojana kromosomska preuređenja²⁷, za koje je FISH glavna metoda dijagnosticiranja. No, metoda FISH omogućava analizu samo ciljanih kromosomskih preuređenja, te eventualno analizu diploidnosti za tri do sedam kromosoma. S druge strane, metoda aCGH omogućava analizu aneuploidija svih kro-



Slika 2. Delecija 12p11.2 otkrivena molekularnom kariotipizacijom.

Slika prikazuje rezultat aCGH. Lijevo je prikazan cijeli kromosom 12. Crna crta prikazuje prosječne vrijednosti razlike intenziteta među ispitivanim i referentnim DNK-om i crta se nalazi vertikalno u jednoj liniji. U odsjeku 12p11.2 prosjek vrijednosti se značajno pomakne ulijevo, što predstavlja deleciju. Desna slika prikazuje i rezultate SNP-a (engl. *single nucleotide polymorphisms*), gdje se vidi da u odsjeku delecije nema heterozigotnosti (u vertikalnoj liniji u sredini, u regiji delecije nema signala).

mosoma odjednom, a s napretkom tehnologije i otkrivanje mikrodelecija i mikroduplikacija. Posljednjih godina najčešće se primjenjuje biopsija blastociste, nakon čega slijedi probir za aneuploidije pomoću metode aCGH, što omogućava odabir zametaka bez mutacije za prijenos u maternicu, što dokazano poboljšava postotak uspješno iznesenih trudnoća²⁸.

INTERPRETACIJA REZULTATA I GENETIČKO SAVJETOVANJE

Interpretacija rezultata molekularne kariotipizacije predstavlja izazov, pogotovo u slučajevima otkrivanja VUS-a (engl. *variant of unknown significance*) i genomskih mutacija koje prethodno nisu bile opisane, kao i u slučajevima kada su genom-

ske mutacije prisutne u pacijenta i jednog od roditelja (pojam varijabilne penetrabilnosti).

Rezultate analize aCGH možemo svrstati u jednu od četiri kategorija:

1. bez klinički značajnih / patoloških preuređenja / CNV
2. prisutnost klinički značajnih preuređenja koja su izravno vezana uz kliničku sliku pacijenta
3. prisutnost VUS-a u pacijenta i jednog od roditelja
4. prisutnost VUS-a samo u pacijenta, ali ne i roditelja.

Prve dvije kategorije jednostavne su za interpretaciju. U trećoj kategoriji, koja je prisutna u približno 5 % slučajeva²⁹, značenje preuređenja ovisi i o veličini, lokusu, genetičkoj varijabilnosti i heterogenosti lokusa. U slučaju četvrte kategorije izuzetno je važno i traženje informacija na razini gena koji se nalaze u području preuređenja, njihovih funkcija i potencijalne povezanosti s kliničkim obilježjima pacijenta. Pacijente iz treće i četvrte kategorije potrebno je pratiti i nakon godinu dana ponovo ocijeniti status otkrivenog preuređenja. Moguće je da se u tom vremenu promjena klasificira kao benigna ili patološka.

Genetičko savjetovanje nužan je dio svakog genetičkog testa. Kod metode aCGH posebno je važno provesti genetičko savjetovanje prije i poslije testa, zbog već objašnjene mogućnosti pronalaženja VUS-a. Osim važnosti objašnjenja mogućeg pronalaženja VUS-a potrebno je obrazložiti i mogućnosti metode, odnosno da s jednim testom sada možemo otkriti različite sindrome (za razliku od metode FISH koja može otkriti samo jedan specifični sindrom ili samo subtelomerna preuređenja), da je specifičnost i osjetljivost metode za različite sindrome različita i da se rezolucija metode razlikuje ovisno o laboratoriju. Prije testa potrebna je pisana suglasnost pacijenta u kojoj izjavljuje da se slaže s testom. Genetičko savjetovanje u okviru prenatalne dijagnostike posebno je važno kako bi budući roditelji razumjeli mogućnost otkrivanja VUS-a, te povezano s time donijeli daljnje odluke o nastavku trudnoće.

ZAKLJUČAK

Metoda molekularne kariotipizacije, aCGH, značajni je dio kliničke i laboratorijske genetike. Pri-

mjenjuje se u postnatalnoj i prenatalnoj genetičkoj dijagnostici i sve više zamjenjuje klasičnu kariotipizaciju. U postnatalnoj dijagnostici postala je metoda izbora u slučajevima idiopatske mentalne retardacije, zaostajanja u razvoju, dismorfni znakova i prirođenih razvojnih anomalija. U području prenatalne dijagnostike posebice se upotrebljava u slučajevima kada je potrebna analiza cijelog genoma s većom rezolucijom nego onom u klasične kariotipizacije.

ZAHVALE

Zahvaljujemo Mariji Volk, dr. med. za identifikaciju prenatalnog kliničkog slučaja.

Izjava o sukobu interesa: autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

1. Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 2005;14:2:R215–23.
2. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 1992;258:818–21.
3. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:399–407.
4. Hosoki K, Ohta T, Natsume J, Imai S, Okumura A, Matsui T et al. Clinical phenotype and candidate genes for the 5q31.3 microdeletion syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;158A:1891–6.
5. Bartholdi D, Stray-Pedersen A, Azzarello-Burri S, Kibaek M, Kirchoff M, Oneda B et al. A newly recognized 13q12.3 microdeletion syndrome characterized by intellectual disability, microcephaly, and eczema/atopic dermatitis encompassing the HMGB1 and KATNAL1 genes. *Am J Mol Genet* 2014; Forthcoming.
6. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array CGH in the evaluation of dysmorphism, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:182–92.
7. Bragin E, Chatzimichali EA, Wright CF, Hurles ME, Firth HV, Bevan AP et al. DECIPHER: database for the interpretation of phenotype-linked plausibly pathogenic sequence and copy-number variation. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D993–1000.
8. Vulto-van Silfhout AT, van Ravenswaaij CM, Hehir-Kwa JY, Verwiel ET, Dirks R, van Vooren S et al. An update on ECARUCA, the European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations. *Eur J Med Genet* 2013;56:471–4.
9. Riggs ER, Jackson L, Miller DT, Van Vooren S. Phenotypic information in genomic variant databases enhances clinical care and research: the International Standards for

- Cytogenomic Arrays Consortium experience. *Hum Mutat* 2012;33:787–96.
10. MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* 2014;42:D986–92.
 11. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
 12. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* 2010; 464:704–12.
 13. Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H et al. Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet* 2004;41:241–8.
 14. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 2010;86:749–64.
 15. Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P et al. Array analysis and karyotyping: workflow consequences based on a retrospective study of 36,325 patients with idiopathic developmental delay in the Netherlands. *Eur J Med Genet* 2009;52:161–9.
 16. Sisodiya SM, Mefford HC. Genetic contribution to common epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2011;24:140–5.
 17. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* 2012;22:229–37.
 18. Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. Array CGH in patients with learning disability (mental retardation) and congenital anomalies: updated systematic review and meta-analysis of 19 studies and 13,926 subjects. *Genet Med* 2009;11:139–46.
 19. Zuffardi O, Vetro A, Brady P, Vermeesch J. Array technology in prenatal diagnosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011;16:94–8.
 20. Shaffer LG, Dabell MP, Fisher AJ, Coppinger J, Bandholz AM, Ellison JW et al. Experience with microarray-based comparative genomic hybridization for prenatal diagnosis in over 5000 pregnancies. *Prenat Diagn* 2012;32: 976–85.
 21. De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J et al. Cryptic deletions are a common finding in „balanced” reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* 2007;44:750–62.
 22. Schluth-Bolard C, Delobel B, Sanlaville D, Boute O, Cui-sset JM, Sukno S et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. *Eur j med gen* 2009;52:291–6.
 23. Van den Veyver IB, Patel A, Shaw CA, Pursley AN, Kang SH, Simovich MJ et al. Clinical use of array comparative genomic hybridization (aCGH) for prenatal diagnosis in 300 cases. *Prenat Diagn* 2009;29:29–39.
 24. Lamb AN, Rosenfeld JA, Neill NJ, Talkowski ME, Blumenthal I, Girirajan S et al. Haploinsufficiency of SOX5 at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features. *Hum Mutat* 2012;33: 728–40.
 25. Gijsbers AC, Bosch CA, Dauwerse JG, Giromus O, Hansson K, Hilhorst-Hofstee Y et al. Additional cryptic CNVs in mentally retarded patients with apparently balanced karyotypes. *Eur J Med Genet* 2010;53:227–33.
 26. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2010;94:1173–7.
 27. Handyside AH. Preimplantation genetic diagnosis after 20 years. *Reprod Biomed Online* 2010;21:280–2.
 28. Liang L, Wang CT, Sun X, Liu L, Li M, Witz C et al. Identification of chromosomal errors in human preimplantation embryos with oligonucleotide DNA microarray. *PLoS One* 2013;8:e61838.
 29. Darilek S, Ward P, Pursley A, Plunkett K, Furman P, Magoulas P et al. Pre- and postnatal genetic testing by array-comparative genomic hybridization: genetic counseling perspectives. *Genet Med* 2008;10:13–8.