



TESIS DOCTORAL

**BASES GENÉTICAS DE LA DISCAPACIDAD
INTELECTUAL Y LOS TRASTORNOS DEL
ESPECTRO AUTISTA: APLICACIÓN DE LAS
NUEVAS TECNOLOGÍAS AL ANÁLISIS DE
VARIANTES DEL NÚMERO DE COPIAS (CNVs)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
INÉS QUINTELA GARCÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR
FACULTAD DE MEDICINA E ODONTOLOGÍA
SANTIAGO DE COMPOSTELA
JULIO 2016





El Profesor Doctor **Ángel María Carracedo Álvarez**, Catedrático de Medicina Legal de la Facultade de Medicina e Odontoloxía de la Universidade de Santiago de Compostela, el Doctor **Francisco Barros Angueira**, Jefe de Laboratorio de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica y el Doctor **Jesús Eirís Puñal**, Adjunto Clínico del Servicio de Neuroloxía Pediátrica del Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

CERTIFICAN

que la presente memoria que lleva por título "*Bases genéticas de la discapacidad intelectual y los trastornos del espectro autista: aplicación de las nuevas tecnologías al análisis de variantes del número de copias (CNVs)*" de la Licenciada en Biología por la Universidade de Santiago de Compostela, Doña **Inés Quintela García**, ha sido realizada bajo su dirección, considerando que reúne los requisitos para optar al Grado de Doctor y autorizando su presentación ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 11 de julio de 2016.

Fdo.: Prof. Dr. Ángel Carracedo Álvarez

Fdo.: Dr. Francisco Barros Angueira

Fdo.: Dr. Jesús Eirís Puñal

Fdo.: Dña. Inés Quintela García

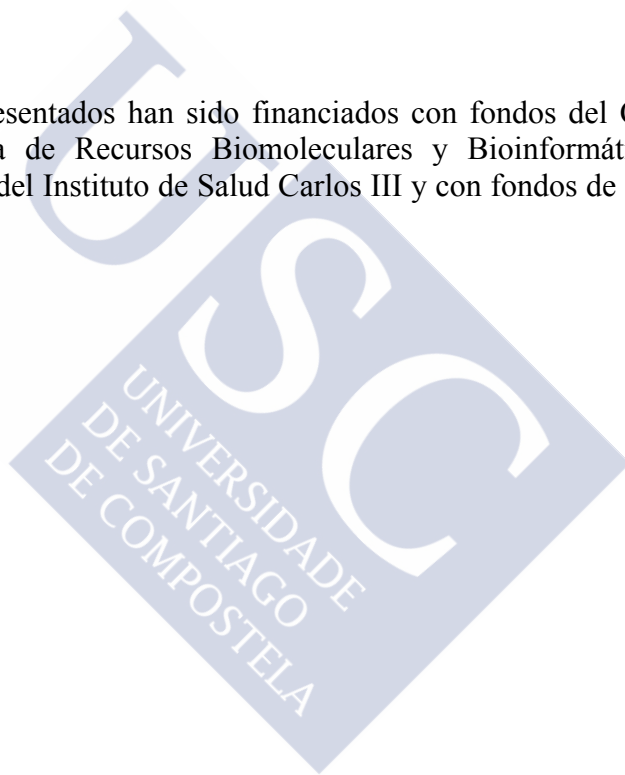




FINANCIACIÓN



Los trabajos aquí presentados han sido financiados con fondos del Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos (IPT13/0001 - ISCIII-SGEFI / FEDER) del Instituto de Salud Carlos III y con fondos de la Fundación María José Jove.





AGRADECIMIENTOS





AGRADECIMIENTOS

En la elaboración de este trabajo han colaborado muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento.

GRACIAS a mis Directores - Prof. Dr. Ángel Carracedo, Dr. Francisco Barros y Dr. Jesús Eiris. GRACIAS, Ángel, por permitirme formar parte del Grupo de Medicina Xenómica y por el infinito tiempo y esfuerzo que dedicas para que podamos seguir adelante. GRACIAS, Pancho, por proponerme un tema de tesis tan interesante, por dedicarme el tiempo que sé que no tienes y por estar ahí siempre que te necesitamos. GRACIAS, Jesús, por participar en este proyecto, por el tiempo (que robamos a tu excedencia!!) dedicado a la revisión y la elaboración de las historias clínicas de los pacientes y por tu labor en la supervisión de la tesis. Quiero incluir aquí, también, a la Dra. Raquel Cruz. GRACIAS, Raquel, por ayudarme en esto (creo que mereces estar entre mis Directores) pero también por estar siempre dispuesta a echar una mano, sea en forma de análisis estadísticos, de clases en los cursos del CeGen (qué haríamos sin ti!), de *pintado* de *clusters* (jeje!!)...ay, de verdad, GRACIAS!!

GRACIAS a cada uno de los pacientes y a sus familiares, por haber accedido a participar en este estudio.

GRACIAS a los facultativos de los Servicios de Neurología Pediátrica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela - Prof. Dr. Manuel Castro-Gago, Dra. Carmen Gómez-Lado y Dr. David Dacruz - y del Hospital Universitario Lucus Augusti - Dra. Laura Pérez-Gay- y a las compañeras del Grupo de Psicología y Psiquiatría - Dra. Montse Fernández-Prieto, Dra. Lorena Gómez-Guerrero, Dra. Mariela Resches, Dra. Adriana Sampaio, Rocío Martínez, Aitana Alonso y Cristina Gutiérrez - por su contribución en la elaboración de las historias clínicas de los pacientes.

GRACIAS a las compañeras de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX)- Dra. Luz Míguez, Dra. Manuela Ariza, Dra. Patricia Blanco y las Técnicas de Laboratorio Marga Formoso y Rocío González - por su contribución en la realización de las pruebas genéticas realizadas a los pacientes. GRACIAS al equipo bioinformático de la FPGMX -Dr. Jorge Amigo y Xabi Bello- por la elaboración de los programas informáticos para los análisis genéticos.

GRACIAS a los compañeros de trabajo con los que comparto el día a día - María T, Juan, Ana P, Shaila, Jose, Miriam, Sandra, Bea S, Susana, Narenkha, Tatiana, Ángela, Andrea, María B, Eva, Montse, Marina, Mariña, Alex, Rocío, María D, Esther y Vicente. GRACIAS por vuestra colaboración. GRACIAS, en especial, a Ana P, Shaila, Jose, Miriam y Sandra, por su labor en el laboratorio de Affymetrix, donde se realizaron la mayor parte de las pruebas genéticas.

Gracias a Raquel de la Guerra, Juan C. y Elena A. por su apoyo.

GRACIAS a mis compañeros del Grupo de Medicina Xenómica (FPGMX, CIMUS, Instituto de Ciencias Forenses, IDIS...).

GRACIAS Noa, Cata, Jose y Shaila por vuestra amistad. *Bicos e abrazos!!!*

GRACIAS a mis amigos, a mi familia y a mis padres. GRACIAS.



ÍNDICE DE CONTENIDOS





ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS	xix
INTRODUCCIÓN	1
1.1 DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA	3
1.1.1 Discapacidad intelectual.....	3
1.1.1.1 Definición y clasificación de la discapacidad intelectual.....	3
1.1.1.2 Prevalencia de la discapacidad intelectual	4
1.1.1.3 Etiología de la discapacidad intelectual	4
1.1.2 Trastorno del espectro autista.....	5
1.1.2.1 Definición del trastorno del espectro autista.....	5
1.1.2.2 Prevalencia del trastorno del espectro autista.....	6
1.1.2.3 Etiología del trastorno del espectro autista.....	6
1.1.3 Manifestaciones fenotípicas asociadas a la discapacidad intelectual y los trastornos del espectro autista	7
1.2 BASES GENÉTICAS DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA	8
1.2.1 Variación genética.....	8
1.2.1.1 Variantes del número de copias o CNVs.....	8
1.2.1.2 Mecanismos de formación de las CNVs	9

1.2.1.2.1 Mecanismos de formación de CNVs recurrentes. Recombinación Homóloga No Alélica o NAHR.....	9
1.2.1.2.2 Mecanismos de formación de CNVs no recurrentes	11
1.2.2 Técnicas para el estudio de las variantes del número de copias.....	12
1.2.3 Genética de la discapacidad intelectual	16
1.2.3.1 Síndromes genéticos con DI.....	16
1.2.3.2 Aberraciones cromosómicas microscópicas en DI.....	16
1.2.3.3 Variantes del número de copias en DI.....	17
1.2.3.3.1 Expresividad variable y penetrancia incompleta	20
1.2.3.3.2 Causas de la expresividad variable y/o la penetrancia incompleta.....	21
1.2.3.4 Variantes de un único nucleótido en DI	23
1.2.4 Genética de los trastornos del espectro autista	28
1.2.4.1 Estudios de asociación del genoma completo en TEA.....	28
1.2.4.2 Síndromes genéticos con TEA	29
1.2.4.3 Aberraciones cromosómicas microscópicas en TEA	29
1.2.4.4 Variantes del número de copias en TEA	30
1.2.4.5 Variantes de un único nucleótido en TEA.....	33
JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.....	39
RESULTADOS	43
ARTÍCULO I. Copy number variation analysis of 573 patients with intellectual disability from NW Spain.....	47
ARTÍCULO II. Caracterización molecular y descripción fenotípica de dos casos con aberraciones cromosómicas recíprocas en la región de los síndromes de microdelección/microduplicación 3q29	117

ARTÍCULO III. Clinical characterization of a male patient with the recently described 8q21.11 microdeletion syndrome	121
ARTÍCULO IV. A Maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a <i>de novo</i> <i>SOX5</i> deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features	125
ARTÍCULO V. Interstitial microdeletions including the chromosome band 4q13.2 and the <i>UBA6</i> gene as possible causes of intellectual disability and behavior disorder	129
ARTÍCULO VI. Deleción en el gen <i>RPS6KA3</i> en una mujer con un fenotipo clásico del síndrome de Coffin-Lowry incluyendo episodios de caída inducidos por estímulo	133
ARTÍCULO VII. Copy number variation analysis of patients with autism spectrum disorder from NW Spain	137
ARTÍCULO VIII. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and comorbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion	187
ARTÍCULO IX. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain	191
ARTÍCULO X. Phenotypic descriptions of two female patients with neurodevelopmental disorders and non-overlapping exonic deletions affecting the <i>AUTS2</i> gene: Comparison of their neurocognitive, behavioral and clinical profiles and literature review	195
DISCUSIÓN	221
CONCLUSIONES	247
BIBLIOGRAFÍA	253





ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

DSM-5:	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition.</i>	IR:	<i>Interspersed Repeat.</i>
DI:	Discapacidad Intelectual.	LINE:	<i>Long INterspersed Element.</i>
RGD:	Retraso Global del Desarrollo.	SINE:	<i>INterspersed Element.</i>
DI-NE:	Discapacidad Intelectual-No Especificada.	HERV:	<i>Human Endogenous RetroVirus.</i>
TEA:	Trastorno del Espectro Autista.	Mb:	Megabase.
CDC:	<i>Centers for Disease Control and Prevention.</i>	NHEJ:	<i>Non Homologous End-Joining.</i>
TDAH:	Trastorno por Déficit de Atención con Hiperactividad.	LTR:	<i>Long Terminal Repeat.</i>
SNP:	<i>Single-Nucleotide Polymorphism.</i>	MIR:	<i>Mammalian Interspersed Repeat.</i>
CNV:	<i>Copy-Number Variation.</i>	FoSTes:	<i>Fork Stalling and Template Switching.</i>
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.	MMBIR:	<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication.</i>
kb:	kilobase.	FISH:	<i>Fluorescence In Situ Hybridization.</i>
pb:	pares de bases.	PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction.</i>
CNP:	<i>Copy Number Polymorphism.</i>	CGH:	<i>Comparative Genomic Hybridization.</i>
DGV:	<i>Database of Genomic Variants.</i>	M-FISH:	<i>Multiplex-FISH.</i>
NAHR:	<i>Non Allelic Homologous Recombination.</i>	qPCR:	<i>Quantitative-PCR.</i>
OMIM:	<i>Online Mendelian Inheritance In Man.</i>	QF-PCR:	<i>Quantitative Fluorescent-PCR.</i>
LCR:	<i>Low Copy Repeat.</i>	MLPA:	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification.</i>
SD:	<i>Segmental Duplications.</i>	HR-CGH:	<i>High Resolution-CGH.</i>

BAC:	<i>Bacterial-derived Artificial Chromosome.</i>	SSC:	<i>Simons Simplex Collection.</i>
PACs:	<i>P1-derived Artificial Chromosome.</i>	AR:	Autosómico/a/s recesivo/a/s.
ADNc:	ADN complementario.	GWAS:	<i>Genome Wide Association Study/ies.</i>
NGS:	<i>Next Generation Sequencing.</i>	OR:	<i>Odd Ratio.</i>
SNV:	<i>Single-Nucleotide Variation.</i>	SLOS:	Síndrome de Smith-Lemli-Opitz.
<i>indels:</i>	inserciones y deleciones.	COH1:	Síndrome de Cohen.
WGS:	<i>Whole Genome Sequencing.</i>	SOTOS1:	Síndrome de Sotos.
WES:	<i>Whole Exome Sequencing.</i>	CWS1:	Síndrome de Cowden.
ISCA:	<i>International Standards for Cytogenomic Arrays.</i>	MBS:	Síndrome de Moebius.
ACM:	Anomalías Congénitas Múltiples.	TS:	Síndrome de Timothy.
SXF:	Síndrome del X frágil.	AGP:	<i>Autism Genome Project.</i>
RTT:	Síndrome de Rett.	ASC:	<i>Autism Sequencing Consortium.</i>
SA:	Síndrome de Angelman.	FDR:	<i>False Discovery Rate.</i>
PWS:	Síndrome de Prader-Willi.	MIP:	<i>Molecular Inversion Probe.</i>
RSTS1:	Síndrome de Rubinstein-Taybi.	ARN:	Ácido ribonucleico.
TSC:	Esclerosis tuberosa.	FPGMX:	Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.
NF1:	Neurofibromatosis tipo 1.	TOC:	Trastorno Obsesivo Compulsivo.
DMD:	Distrofia Muscular de Duchenne.	DECIPHER:	<i>DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources.</i>
NS1:	Síndrome de Noonan.	ECARUCA:	<i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations.</i>
WBS:	Síndrome de Williams-Beuren.	CES:	Síndrome del ojo de gato.
SMS:	Síndrome de Smith-Magenis.		
DGS:	Síndrome de DiGeorge		
VCFS:	Síndrome velocardiofacial.		
LX:	Ligado/a/s al cromosoma X.		
BP:	<i>Breakpoint.</i>		



INTRODUCCIÓN



1 INTRODUCCIÓN

1.1 DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

1.1.1 Discapacidad intelectual

1.1.1.1 Definición y clasificación de la discapacidad intelectual

De acuerdo con la quinta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales o DSM-5 (de sus siglas en inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition*), publicado en el año 2013 por la Asociación Americana de Psiquiatría, la discapacidad intelectual se incluye dentro de los "Trastornos del desarrollo neurológico" y se clasifica en tres categorías:

(a) La discapacidad intelectual (DI), equivalente al término diagnóstico "trastornos del desarrollo intelectual" de la Clasificación Internacional de Enfermedades-11, se inicia durante el periodo del desarrollo e incluye deficiencias en el funcionamiento intelectual y en las habilidades adaptativas en los dominios conceptual, social y práctico. Las limitaciones de las funciones intelectuales, confirmadas mediante la evaluación clínica y pruebas de inteligencia estandarizadas individualizadas, incluyen el razonamiento, la resolución de problemas, la planificación, el pensamiento abstracto, el juicio, el aprendizaje académico y el aprendizaje a partir de la experiencia. Las deficiencias del comportamiento adaptativo producen fracaso del cumplimiento de los estándares de desarrollo y socioculturales para la autonomía personal y la responsabilidad social. Además, sin apoyo continuo, limitan el funcionamiento en una o más actividades de la vida cotidiana, como la comunicación, la participación social y la vida independiente en múltiples entornos (ej. el hogar, la escuela, el trabajo y la comunidad). El DSM-5 enfatiza la necesidad de usar tanto medidas clínicas como pruebas de inteligencia estandarizadas en el diagnóstico de la DI y mantiene los niveles de gravedad en leve, moderado, grave y profundo aunque, a diferencia de los textos anteriores, la gravedad del daño se basa más en el comportamiento adaptativo que únicamente en las medidas del cociente intelectual. El trastorno se considera crónico y con frecuencia presenta comorbilidades con otras condiciones mentales, como depresión, trastorno por déficit de atención e hiperactividad y trastornos del espectro autista.

(b) El retraso global del desarrollo (RGD) se aplica cuando la edad del paciente, inferior a 5 años, impide valorar de forma fiable el nivel de gravedad clínica pero se detectan deficiencias en los hitos del desarrollo en varias áreas del funcionamiento intelectual. Este diagnóstico debe ser revisado después de un periodo de tiempo.

(c) La discapacidad intelectual no especificada (DI-NE) es una categoría que sólo se utiliza en circunstancias excepcionales y que también se debe volver a evaluar pasado un periodo de tiempo. Se aplica a individuos mayores de 5 años cuando la gravedad de la DI es difícil de establecerse mediante procedimientos localmente disponibles o imposible de valorarse debido a deterioros sensoriales o físicos asociados, presencia de problemas de comportamiento graves o concurrencia de trastorno mental (APA 2013).

1.1.1.2 Prevalencia de la discapacidad intelectual

Globalmente, se estima que la DI tiene una prevalencia del 1-3% en las sociedades occidentales y que ~0,3-0,6% de la población presenta DI grave (Leonard y Wen 2002; Patel et al. 2010; APA 2013). No obstante, estos valores varían considerablemente en la literatura debido, posiblemente, a diferencias en el diseño de los estudios, edad de los pacientes, población evaluada y/o definición de DI (Drews et al. 1995; Roeleveld et al. 1997; Leonard y Wen 2002; Ropers 2010; Maulik et al. 2011). Además, mientras que las estimas de frecuencia de las formas graves son relativamente estables, la DI leve tiene una prevalencia más variable ya que, con frecuencia, depende fuertemente de factores ambientales (Drews et al. 1995; Roeleveld et al. 1997; Leonard y Wen 2002). La DI está presente en todas las poblaciones, clases sociales y culturas (Leonard y Wen 2002; APA 2013), si bien tiende a ser más prevalente en áreas de menor estatus socioeconómico y en países en desarrollo, particularmente en las formas leves (Drews et al. 1995; Roeleveld et al. 1997; Durkin et al. 1998; Durkin 2002; Emerson 2007), donde factores ambientales (como la malnutrición, privación cultural y pobre sistema de salud) podrían estar actuando (Roeleveld et al. 1997; Durkin et al. 1998; Durkin et al. 2000; Durkin 2002; Emerson 2007). En varios de estos países, además, la consanguinidad parental podría ser otro factor determinante (Costeff et al. 1972; Bashi 1977). En general, los defectos cognitivos son significativamente más comunes en hombres que en mujeres (relación hombre: mujer media de 1,6:1), aunque estas diferencias disminuyen en las formas de DI grave (APA 2000; APA 2013).

1.1.1.3 Etiología de la discapacidad intelectual

La DI puede estar causada por factores -tanto ambientales como genéticos- que afectan al desarrollo y el funcionamiento del sistema nervioso y que pueden actuar prenatal, perinatal o postnatalmente. Los factores ambientales más frecuentes incluyen malnutrición durante la gestación, exposición del feto al alcohol (espectro de anomalías relacionados con la exposición prenatal al alcohol) u otros compuestos neurotóxicos, infecciones prenatales (daño cerebral fetal debido a la transmisión materna de enfermedades infecciosas como rubeola, toxoplasmosis o citomegalovirus) y postnatales, nacimiento prematuro, asfixia peri- y postnatal y otros procesos (Patel et al. 2010; Ropers 2010). Factores socioeconómicos, como el nivel de renta, circunstancias familiares y ambiente cultural, se considera que también tienen un papel en la prevalencia de la DI (Ropers 2010). En los países pobres, la malnutrición es uno de los principales factores de riesgo mientras que, en los países desarrollados, especialmente en USA, la exposición fetal al alcohol es considerada la causa evitable más frecuente (Silverman 2009; Ropers 2010).

Los factores genéticos implicados en la DI se detallan en el apartado "1.2.3 Genética de la discapacidad intelectual" de esta Introducción.

1.1.2 Trastorno del espectro autista

1.1.2.1 Definición del trastorno del espectro autista

De acuerdo con el DSM-5, el trastorno del espectro autista (TEA) se incluye en los "Trastornos del desarrollo neurológico" y su diagnóstico actual se basa en el cumplimiento de los siguientes criterios:

A. Deficiencias persistentes en la comunicación social y en la interacción social en diferentes contextos, no debidos a retrasos del desarrollo generales y manifestados por los tres ítems siguientes: (1) Déficits en la reciprocidad socioemocional. (2) Déficits en los comportamientos comunicativos no verbales empleados para la interacción social. (3) Déficits en el desarrollo, el mantenimiento y la comprensión de las relaciones.

B. Patrones restrictivos y repetitivos de comportamiento, intereses o actividades que se manifiestan en, al menos, dos de las siguientes puntos: (1) Habla, movimientos o utilización de objetos de modo estereotipado o repetitivo. (2) Excesiva resistencia al cambio, excesiva adherencia a rutinas o patrones ritualizados de comportamiento verbal o no verbal. (3) Intereses altamente restringidos y fijos, anómalos en su intensidad o foco de interés. (4) Hiper- o hipo-reactividad a los estímulos sensoriales o interés inusual por aspectos sensoriales del entorno.

C. Los síntomas se presentan en las primeras etapas del periodo del desarrollo; no obstante, podrían no manifestarse en su totalidad hasta que la demanda social exceda las capacidades limitadas o permanecer enmascarados por estrategias aprendidas en fases posteriores de la vida.

D. Los síntomas causan un deterioro clínicamente significativo en el ámbito social, laboral u otras áreas importantes de la funcionalidad diaria.

E. Estas alteraciones no se explican mejor por DI/RGD. La DI y el TEA con frecuencia coinciden en un mismo individuo; para hacer diagnóstico de comorbilidades de TEA y DI, la comunicación social debe estar por debajo de lo previsto para el nivel general de desarrollo.

La gravedad del TEA se establecerá en función del grado de ayuda necesaria ("necesita ayuda muy notable", "necesita ayuda notable" o "necesita ayuda") para cada uno de los dominios psicopatológicos (comunicación social / comportamientos restringidos y repetitivos). Entre los aspectos moduladores o especificadores en la categorización diagnóstica del TEA se mencionan 1) la existencia o no de deterioro intelectual acompañante, 2) la existencia o no de problemas de lenguaje y, en su caso, se registrará el grado actual de funcionamiento verbal, 3) si existe catatonía concurrente y, por último, en el caso de asociación con una afección médica o genética conocida, un factor ambiental u otro trastorno del desarrollo neurológico, mental o del comportamiento, se registrará como "trastorno de espectro autista asociado a (afección, factor ambiental o trastorno asociado)" (APA 2013).

1.1.2.2 Prevalencia del trastorno del espectro autista

El TEA tiene una prevalencia estimada de ~0,6-1% (Elsabbagh et al. 2012; APA 2013) y afecta entre 3-4 veces más a hombres que a mujeres, llegando a alcanzar una relación hombre: mujer de 10:1-11:1 en presentaciones con habilidades cognitivas normales (Gillberg et al. 2006; Betancur 2011; Miles 2011). En Estados Unidos, las últimas estimaciones, derivadas del estudio realizado por los Centros para el Control y la Prevención de las Enfermedades (CDC, de sus siglas en inglés *Centers for Disease Control and Prevention*) en el año 2012 con niños de 8 años, la sitúan en 1 afecto por cada 68 no afectados. Esta prevalencia fue significativamente mayor entre niños (1 de cada 42) que entre niñas (1 de cada 189) (Christensen et al. 2016).

1.1.2.3 Etiología del trastorno del espectro autista

Estudios familiares y de gemelos han proporcionado fuerte evidencia de que los factores genéticos juegan un papel principal en la etiología del TEA (Ozonoff et al. 2011; Ronald y Hoekstra 2011); de hecho, estudios de familias muestran que el riesgo de recurrencia relativo de hermanos de niños con TEA es aproximadamente 20-25 veces superior al de la población general (Geschwind 2009; Ozonoff et al. 2011) y estudios de gemelos evidencian una concordancia del fenotipo autista del ~73-95% para gemelos monocigóticos (Geschwind 2011) frente al ~10-30% para gemelos dicigóticos (Geschwind 2009; Hallmayer et al. 2011; Ronald y Hoekstra 2011). Más recientemente y en un estudio epidemiológico llevado a cabo con 2,5 millones de familias suecas, el riesgo de recurrencia relativo de TEA, entendido como el riesgo de TEA de un individuo con un hermano o primo afecto en comparación con el de un individuo sin historia familiar de TEA, se situó en 153 para gemelos monocigóticos, ~10 para hermanos, ~3 para medios hermanos y 2 para primos (Sandin et al. 2014). Este y otros estudios evidencian que el TEA se sitúa entre los trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos más altamente heredables (Kumar y Christian 2009; Lichtenstein et al. 2010; Constantino et al. 2013), aunque sus estimaciones de heredabilidad varían entre el 40-80% (Geschwind 2011; Hallmayer et al. 2011; Sandin et al. 2014).

Por tanto, aunque los factores genéticos podrían ser los principales responsables de la ocurrencia del TEA, no explicarían la totalidad de los casos y es posible que factores ambientales específicos actúen, de forma independiente o en combinación con alteraciones genéticas, como factores de riesgo o desencadenantes de este fenotipo (Grabrucker 2012; Won et al. 2013). Algunos de los factores ambientales de riesgo propuestos incluirían infección durante el embarazo, deficiencia en zinc, nutrición y diabetes materna, exposición a toxinas (ácido valproico, talidomida u otros fármacos psiquiátricos), estrés prenatal y perinatal, así como prematuridad y edad parental avanzada en el momento de la concepción [revisado por (Grabrucker 2012; Won et al. 2013)]. No obstante, tal y como se revisa y discute en (Grabrucker 2012), las evidencias de asociación para algunos de estos factores son débiles y requieren más estudios para ser considerados de riesgo y/o para entender su mecanismo de actuación.

Los factores genéticos implicados en los TEA se detallan en el apartado "1.2.4 Genética de los trastornos del espectro autista" de esta Introducción.

1.1.3 Manifestaciones fenotípicas asociadas a la discapacidad intelectual y los trastornos del espectro autista

Con frecuencia, la DI y los TEA se acompañan de otros problemas médicos, como manifestaciones neurológicas, del neurodesarrollo y del comportamiento. Por un lado, manifestaciones frecuentemente asociadas a DI incluyen epilepsia/convulsiones, hipotonía, talla baja, obesidad/bajo peso, microcefalia/macrocefalia, rasgos dismórficos, anomalías congénitas (como problemas cardiovasculares, oftalmológicos, musculoesqueléticos, genitourinarios o gastrointestinales, entre otros) y otros trastornos mentales y del neurodesarrollo, como trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), trastornos depresivos, trastorno bipolar, trastornos de ansiedad, TEA, trastorno de movimientos estereotipados y trastorno del control de los impulsos. Entre los individuos con DI más grave también pueden concurrir comportamientos perturbadores y de agresión (APA 2013). Los pacientes con TEA, por su parte, presentan frecuentemente epilepsia/convulsiones y anomalías electroencefalográficas (~25% de niños con autismo presentan convulsiones), insomnio y otras alteraciones del sueño (~60% de niños con autismo), problemas motores (aunque la mayoría de los niños con autismo tienen un desarrollo motor normal), problemas gastrointestinales (~45% de los niños autistas), obesidad (aunque factores como la medicación o un estilo de vida inactivo podrían contribuir, por lo menos en algunos de estos pacientes) y trastornos del comportamiento y psiquiátricos [revisado por (Miles 2011; Won et al. 2013)].

Además, aunque la DI y el TEA constituyen diagnósticos separados, no puede obviarse un cierto solapamiento entre ellos y muchos procesos que cursan con DI pueden asociarse a TEA y viceversa. Así, diversos estudios han evidenciado que una proporción significativa de individuos con DI cumplen también criterios diagnósticos de autismo, encontrándose prevalencias del 8-20% de autismo en DI y que esta proporción es todavía mayor en DI grave [revisado por (Kaufman et al. 2010; Ellison et al. 2013)]. Además, varios síndromes de DI presentan también rasgos autistas. Algunos ejemplos incluyen el síndrome del X-frágil (25-47% de los casos pueden padecer TEA), el síndrome de Down (con una prevalencia de TEA del 5-10%), esclerosis tuberosa (16-48% pueden presentar TEA) y, entre otros, los síndromes de Angelman, Rett, Joubert y Cohen [revisado por (Kaufman et al. 2010; Won et al. 2013)]. Por su parte, aproximadamente un 67-75% de los pacientes con TEA cursan con algún grado de DI [revisado por (Kaufman et al. 2010; Miles 2011)]. Adicionalmente, la DI y el TEA comparten múltiples dominios fenotípicos; así, los principales rasgos del TEA, como anomalías de lenguaje, déficit social y estereotipias, pueden verse frecuentemente en grados variables en individuos con DI [revisado por (Kaufman et al. 2010)].

Este solapamiento fenotípico de la DI y el TEA se ve reflejado en el hallazgo de genes individuales y alteraciones cromosómicas que pueden causar uno y otro fenotipo (o ambos) en diferentes individuos (Mefford et al. 2012), siendo *NLGN4*, *SHANK3*, *PTCHDI*, *IL1RAP1*, *JARIDIC*, *SYNGAP1* o *GRIK2* algunos ejemplos (Kaufman et al. 2010). Esta variabilidad fenotípica se extiende a otros trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos (TDAH, esquizofrenia o trastorno bipolar) y problemas neurológicos (epilepsia) (Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013). Aunque no se conocen en su totalidad la base de esta expresividad variable, algunas explicaciones plausibles incluyen alelos modificadores en el *background* genético del individuo, eventos epigenéticos, factores ambientales y/o procesos estocásticos (ver apartado 1.2 de esta Introducción).

1.2 BASES GENÉTICAS DE LA DISCAPACIDAD INTELECTUAL Y EL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA

1.2.1 Variación genética

Los primeros trabajos dedicados al análisis del genoma humano revelaron que los polimorfismos de un único nucleótido o SNPs (de sus siglas en inglés *Single-Nucleotide Polymorphisms*) eran la principal fuente de variabilidad genética y fenotípica humana (Sachidanandam et al. 2001; International HapMap 2003; International HapMap 2005). Sin embargo, gracias al desarrollo y el avance de las nuevas tecnologías en los últimos años, se ha podido demostrar la existencia de variación estructural adicional en el genoma humano. Bajo esta denominación se encuentran tanto las variaciones microscópicas como las submicroscópicas, entre las que se incluyen deleciones, inserciones, duplicaciones o amplificaciones (colectivamente denominadas “variantes del número de copia” o CNVs (del inglés, *Copy-Number Variations*) así como inversiones y translocaciones (Scherer et al. 2007).

1.2.1.1 Variantes del número de copias o CNVs

Una CNV se define como un fragmento de ADN de tamaño ≥ 1 kb presente en un número de copia variable en relación a un genoma de referencia (Feuk et al. 2006; Lupski 2007). No obstante, el incremento de la capacidad resolutoria de las técnicas de nueva generación está permitiendo detectar CNVs de menor tamaño, ampliándose el término a pérdidas y ganancias de fragmentos de ADN > 50 pb (Alkan et al. 2011; Zarrei et al. 2015). El término CNV no implica ni efecto fenotípico ni datos de frecuencia, denominándose CNV polimórfica, polimorfismo del número de copia o CNP (CNP, del inglés *Copy Number Polymorphism*) cuando la CNV está presente en más del 1% de la población y CNV rara cuando su frecuencia es inferior a este valor. Estas variantes cuantitativas pueden suponer ganancias (inserciones, duplicaciones y amplificaciones) o pérdidas (deleciones hemicigotas y genotipos nulos o deleciones homocigotas) genómicas del número de copias (Scherer et al. 2007).

Las primeras evidencias de que las CNVs contribuyen con la variabilidad fenotípica normal, sin tener necesariamente un efecto patogénico, datan de finales de los años 90 (Barber et al. 1998), si bien no es hasta el año 2004 cuando dos estudios independientes demostraron la presencia, a lo largo de todo el genoma humano, de CNVs submicroscópicas (< 500 kb) en individuos control (Iafate et al. 2004; Sebat et al. 2004). Los resultados de estas y otras publicaciones posteriores se recopilan y actualizan en la *Database of Genomic Variants* (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>), en la cual se cataloga la variación estructural (entendida como alteraciones genómicas que implican segmentos de ADN de tamaño > 50 pb) identificada en población control (MacDonald et al. 2014).

Se estima que, en cada genoma individual, las CNVs representan un 1,2% de diferencias en relación al genoma humano de referencia (Pang et al. 2010) y se sabe que, en su conjunto y a nivel nucleotídico, las variaciones estructurales generan millones de nucleótidos de heterogeneidad en cada genoma individual humano. Por ello, suponen una importante contribución a la diversidad genética y a la susceptibilidad a padecer enfermedades en los

humanos [revisado por (Zhang et al. 2009b; Stankiewicz y Lupski 2010; Almal y Padh 2012)].

1.2.1.2 Mecanismos de formación de las CNVs

Las variaciones estructurales, tanto cuantitativas como equilibradas, son generadas por reordenamientos genómicos que pueden categorizarse en dos grupos principales: reordenamientos recurrentes (aquellos que tienen lugar en múltiples individuos no relacionados, comparten intervalos de reordenamiento, tamaño y puntos de rotura) y reordenamientos no recurrentes (aquellos que ocurren en un locus único, pueden variar en tamaño y tienen diferentes puntos de rotura) (Zhang et al. 2009a).

1.2.1.2.1 Mecanismos de formación de CNVs recurrentes. Recombinación Homóloga No Alélica o NAHR

Para los reordenamientos cromosómicos recurrentes, el mecanismo de formación predominante es la Recombinación Homóloga No Alélica o NAHR (del inglés, *Non Allelic Homologous Recombination*). Se trata de un mecanismo que resulta en ganancia, pérdida o inversión de regiones cromosómicas flanqueadas por repeticiones del genoma (Figura 1) y es responsable de trastornos genómicos como el síndrome de Williams-Beuren (microdelección 7q11.23; OMIM 194050) y la microduplicación 7q11.23 recíproca (OMIM 609757), los síndromes Smith-Magenis (microdelección 17p11.2; OMIM 182290) y Potocki-Lupski (microduplicación 17p11.2 recíproca; OMIM 610883) o el síndrome de DiGeorge/velocardiofacial (microdelección 22q11.21; OMIM 188400, 192430) y la microduplicación 22q11.2 recíproca (OMIM 608363), entre otros. Las repeticiones genómicas que pueden ser sustrato de eventos de NAHR incluyen tanto repeticiones de bajo número de copias o LCRs (del inglés *Low Copy Repeats*), como secuencias altamente repetitivas (*high-copy repeats* en inglés) (Stankiewicz y Lupski 2002). Las LCRs, también denominadas duplicaciones segmentarias o SDs (del inglés, *Segmental Duplications*), son numerosas en el genoma humano y se definen como bloques de secuencias repetitivas de entre 1-400 kb con alto grado de homología (> 90%) entre ellas. Aquellas LCRs con longitud > 10 kb y más de ~97% de secuencia idéntica pueden generar inestabilidad genómica local y representan un sustrato idóneo para la recombinación y la formación, en consecuencia, de reordenamientos cromosómicos recurrentes (Stankiewicz y Lupski 2010). Así, eventos de NAHR entre pares de LCRs directamente orientadas pueden originar microdeleciones y microduplicaciones de la secuencia genómica comprendida entre ambas (Figura 1.a); en cambio, cuando las LCRs que participan en la NAHR están opuestamente orientadas, se generan inversiones genómicas (Stankiewicz y Lupski 2002; Stankiewicz y Lupski 2010) (Figura 1.b). Por otro lado, la NAHR puede ocurrir en la meiosis y, en menor frecuencia, en la mitosis y puede darse entre dos cromosomas homólogos (intercromosómica), entre cromátidas separadas de un mismo cromosoma (intracromosómica o intercromátida) o entre segmentos de una misma cromátida (intracromátida). Los primeros dos tipos de eventos NAHR pueden generar microdeleciones y microduplicaciones recíprocas (Figura 1.a), mientras que la NAHR intracromátida únicamente origina microdeleciones (Figura 1.c) (Stankiewicz y Lupski 2002; Zhang et al. 2009b; Stankiewicz y Lupski 2010; Malhotra y Sebat 2012; Chen et al. 2014). Tal y como ha sido revisado recientemente, propiedades de las SDs entre las que se incluyen la longitud de homología, distancia y similitud de secuencia estarían implicadas en la frecuencia de la NAHR (Chen et al. 2014).

Figura 1. Recombinación homóloga no alélica (NAHR) entre LCRs/SDs.

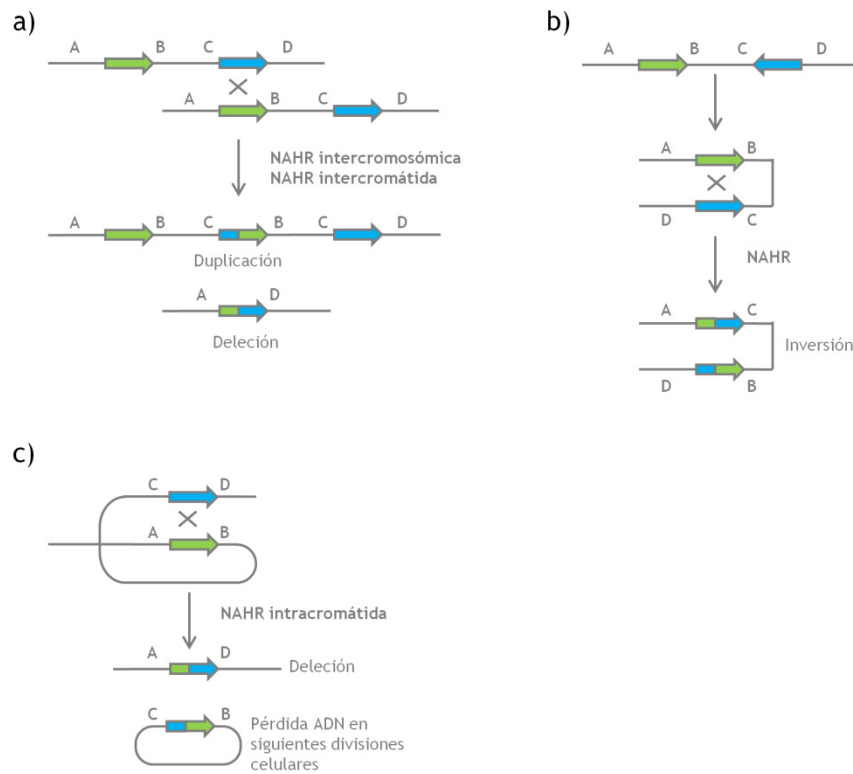


Figura 1. Recombinación homóloga no alélica (NAHR) entre LCRs/SDs. a) NAHR inter cromosómica o inter cromátida entre pares de LCRs/SDs directamente orientadas puede originar deleciones y duplicaciones recíprocas. b) NAHR entre pares de LCRs/SDs inversamente orientadas puede generar inversiones cromosómicas, sin cambio en el número de copias. c) NAHR inter cromosómica puede generar deleciones y ADN circular que se eliminaría en las siguientes divisiones celulares. Los segmentos de ADN en verde y azul se corresponden con los pares de LCRs/SDs y la dirección de la flecha indica la orientación de las mismas.

Adaptada de (Chen et al. 2014).

Una segunda categoría de repeticiones genómicas, más abundantes en el genoma humano que las LCRs/SDs, son las denominadas secuencias altamente repetitivas. Entre estas, las repeticiones intercaladas o IRs (*Interspersed Repeats* en inglés) son las más comunes y, en su conjunto, suponen alrededor del 44% del genoma humano. La clase principal de IRs está constituida por retrotransposones, entre los que se incluyen los elementos LINE-1 ó L1 (repetición tipo LINE (elemento intercalado largo; del inglés *Long INterspersed Element*) más abundante en el genoma humano) y Alu (repetición tipo SINE (elemento intercalado corto; del inglés *Short INterspersed Element*) más abundante en el genoma) y los HERVs (retrovirus endógenos humanos; del inglés *Human Endogenous RetroViruses*). Estos elementos suponen un ~17%, > 11% y ~4,9% del genoma humano, respectivamente y, al igual que las LCRs/SDs, incrementan la inestabilidad genómica de la región que los contiene y

proporcionan el sustrato idóneo para eventos de NAHR [revisado por (Chen et al. 2014)]. De este modo, favorecen la generación de CNVs, especialmente microdeleciones, como es el caso de la recientemente descubierta deleción 3q13.2q13.31 recurrente (Shuvarikov et al. 2013; Campbell et al. 2014), causante de un fenotipo caracterizado, principalmente, por retraso cognitivo, motor y del lenguaje e hipotonía (Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013).

Los síndromes de microdeleciones y microduplicaciones recurrentes pueden generarse, también, a partir de una inversión polimórfica o de translocaciones equilibradas presentes en uno de los genomas parentales. Estos polimorfismos de inversión ocurren entre secuencias homólogas invertidas y predisponen a NAHR durante la meiosis, pudiendo generar productos recombinantes aberrantes (deleciones y duplicaciones). Así, por ejemplo, la inestabilidad cromosómica de la banda 7q11.23, en la cual se localiza el locus del síndrome de Williams-Beuren y su microduplicación recíproca, está directamente relacionada con su estructura genómica, consistente en un intervalo de copia única flanqueado por tres grandes regiones de LCRs con una homología de secuencia del ~99,5% y que actúan de sustrato de NAHR meiótica (Bayes et al. 2003; Cusco et al. 2008). La presencia de variantes estructurales polimórficas en la región (principalmente una inversión paracéntrica de ~2 Mb y que está presente en el 20-33% de los progenitores transmisores del síndrome de Williams-Beuren frente al 4-5% de la población general) también parece favorecer la aparición de desequilibrios cromosómicos en la descendencia (Bayes et al. 2003; Cusco et al. 2008; Tam et al. 2008).

1.2.1.2.2 Mecanismos de formación de CNVs no recurrentes

Inicialmente, el mecanismo más frecuentemente propuesto para explicar los reordenamientos cromosómicos no recurrentes fue la Unión de Extremos No Homólogos o NHEJ (de sus siglas en inglés *Non Homologous End-Joining*). Se trata de un evento de recombinación no homóloga responsable de la reparación de roturas de ADN de doble cadena causadas, por ejemplo, por la presencia de especies reactivas del oxígeno o por la exposición a radiaciones ionizantes. Si el proceso de reparación no ocurre de forma precisa, pueden producirse deleciones o inserciones en el punto de unión. A diferencia de la NAHR, la NHEJ no requiere secuencias homólogas que actúen como sustrato aunque, con frecuencia, los puntos de rotura de las CNVs originadas a partir de estos eventos se localizan dentro de elementos repetitivos, como LTRs (del inglés, *Long Terminal Repeats*), SINEs, LINEs, *Alu* y MIRs (del inglés, *Mammalian Interspersed Repeats*), lo cual sugiere que también es estimulada por ciertos rasgos de la arquitectura del genoma (Zhang et al. 2009b; Malhotra y Sebat 2012; Chen et al. 2014; Rodgers y McVey 2015). Este mecanismo ha sido sugerido, por ejemplo, para explicar algunos reordenamientos no recurrentes asociados con el síndrome de Smith-Magenis (OMIM 182290) (Shaw y Lupski 2005) y la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher (OMIM 312080) (Lee et al. 2006), así como duplicaciones en el gen *MECP2* (OMIM 300260) (Bauters et al. 2008). No obstante, la NEHJ no es el único mecanismo propuesto para explicar los reordenamientos no recurrentes. Así, algunos modelos alternativos o complementarios son FoSTes (del inglés, *Fork Stalling and Template Switching*) (Lee et al. 2007) y MMBIR (del inglés, *Microhomology-Mediated Break-Induced Replication*) (Hastings et al. 2009); se trata de eventos mitóticos que ocurren durante la replicación del ADN y que están basados en el estancamiento de la horquilla de replicación y pueden originar tanto CNVs como reordenamientos cromosómicos complejos (Zhang et al. 2009a; Zhang et al. 2009b; Malhotra y Sebat 2012; Chen et al. 2014).

1.2.2 Técnicas para el estudio de las variantes del número de copias.

Las CNVs y otras variantes estructurales pueden detectarse mediante una amplia variedad de técnicas que han ido desarrollándose y evolucionando en los últimos años.

Desde hace décadas, gracias a las técnicas de citogenética convencional (cariotipado/bandas G), se han podido identificar aberraciones cromosómicas numéricas (aneuploidías y poliploidías) así como variantes estructurales que afectan a varias megabases de secuencia. Entre los ejemplos más típicos se encuentra el síndrome de Down, asociado a trisomía del cromosoma 21 (Jacobs et al. 1959). Estas tecnologías convencionales son muy informativas para aquellas aberraciones cromosómicas, tanto equilibradas como no equilibradas, detectadas microscópicamente (típicamente > 5-10 Mb) y son ampliamente utilizadas en investigación y en la práctica clínica, si bien presentan una capacidad resolutive máxima limitada y una sensibilidad baja.

Estos problemas se han ido subsanando gracias a la rápida evolución e implantación en la rutina diagnóstica de técnicas moleculares alternativas, entre las que destacan la hibridación *in situ* fluorescente o FISH (de sus siglas en inglés *Fluorescence In Situ Hybridization*), diferentes ensayos cuantitativos basados en la PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) y la hibridación genómica comparada o CGH (del inglés, *Comparative Genomic Hybridization*):

Las primeras técnicas de citogenética molecular, desarrolladas en los años 80, se basaron en los principios de la FISH, mediante la cual se detectan y localizan secuencias de ADN marcadas con fluorescencia que se han unido a secuencias específicas del genoma, tradicionalmente cromosomas en metafase (Bauman et al. 1980). Estas tecnologías moleculares pioneras permitieron incrementar la sensibilidad respecto a las técnicas convencionales aunque, de forma generalizada, su capacidad de resolución siguió limitada a varias megabases de secuencia. Dentro de esta categoría de tecnologías basadas en FISH destacan la FISH múltiple o M-FISH (del inglés, *Multiplex-FISH*) (Speicher et al. 1996) y la CGH (Kallioniemi et al. 1992).

Otras técnicas moleculares de utilidad para la determinación de alteraciones cromosómicas del número de copias están basadas en ensayos cuantitativos mediante PCR, entre las que destacan la PCR cuantitativa o qPCR (del inglés, *Quantitative-PCR*), la PCR cuantitativa fluorescente o QF-PCR (del inglés, *Quantitative Fluorescent-PCR*) y la amplificación múltiple dependiente de ligación o MLPA (del inglés, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). La qPCR es capaz de detectar CNVs de un único exón, aunque tiene una limitada capacidad para detectar dianas múltiples en un único ensayo y su uso está básicamente restringido a la validación de resultados detectados por técnicas de genoma completo (Ceulemans et al. 2012). Por su parte, la QF-PCR se emplea para la identificación de aneuploidías (fundamentalmente en los cromosomas 13, 18, 21, X o Y), sobre todo en diagnóstico prenatal (Mann y Ogilvie 2012). Por su parte, los principios de la MLPA se basan en un ensayo con múltiples sondas (hibridación de las sondas, ligación, PCR y separación de los fragmentos amplificados en un secuenciador capilar), cada una específica de una secuencia diferente de ADN para medir su número de copia (la señal fluorescente normalizada y comparada con el ADN control se corresponde con la cantidad relativa de secuencia de ADN diana en la muestra analizada) (Schouten et al. 2002; Kozłowski et al. 2008; Stuppia et al. 2012).

La técnica de CGH permite evaluar el daño genético global identificando, de forma rápida, anomalías numéricas y estructurales desequilibradas. La principal ventaja de este método es que no requiere de cultivos celulares ni de la obtención de cromosomas, ya que consiste en realizar una única hibridación del ADN problema y del ADN de referencia normal (marcados diferencialmente con fluorocromos) directamente sobre cromosomas normales fijados en un soporte. Las ganancias y/o pérdidas de ADN son detectadas en función de la relación de intensidades de los dos fluorocromos a lo largo de los cromosomas diana. Esta técnica, desarrollada originalmente para el análisis citogenético de muestras tumorales (Kallioniemi et al. 1992) y aplicada con éxito en la detección de alteraciones desequilibradas constitucionales en distintos tipos de muestras, tenía inicialmente una capacidad resolutoria del orden de 5-10 Mb para las ganancias y de 10-20 Mb para las deleciones (Bentz et al. 1998). Esta limitación fue parcialmente subsanada, inicialmente, con una variante de esta técnica denominada CGH de alta resolución o HR-CGH (del inglés, *High Resolution-CGH*), que permitía detectar desequilibrios cromosómicos submicroscópicos del orden de 3 Mb (Kirchhoff et al. 2000; Kirchhoff et al. 2001). En los últimos años, la base teórica de la CGH se ha aplicado a la tecnología de los *microarrays* (Solinas-Toldo et al. 1997), dando lugar a los denominados *arrays* de CGH. Así, los cromosomas metafases diana de la hibridación son sustituidos por una matriz de secuencias de ADN (específicas de un cromosoma concreto, de regiones concretas del genoma o de todo el genoma) en formato principalmente de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BACs) o de P1 (PACs) (BACs o PACs, del inglés *Bacterial- or P1-derived Artificial Chromosomes*, respectivamente) (Snijders et al. 2001; Fiegler et al. 2003; Chung et al. 2004; Ishkanian et al. 2004), ADNc (Pollack et al. 1999; Heiskanen et al. 2000), amplicones de PCR (Mantripragada et al. 2004; Dhami et al. 2005) u oligonucleótidos (Brennan et al. 2004; Carvalho et al. 2004), consiguiendo incrementar la resolución de las técnicas de CGH convencionales de forma variable en función de la densidad de la matriz diseñada.

También en los últimos años ha habido un creciente avance en las tecnologías de los paneles de SNPs del genoma completo que, aunque originalmente fueron concebidos para el genotipado de SNPs y los estudios de asociación del genoma completo, han ido adquiriendo más protagonismo y utilidad en la determinación de CNVs (Friedman et al. 2006; Redon et al. 2006; Carter 2007; Scherer et al. 2007). En este caso, el ADN genómico marcado con fluorescencia se hibrida con las sondas de oligonucleótidos depositadas sobre el *microarray* y las ganancias y/o pérdidas se detectan comparando la intensidad de señal de la muestra problema con la intensidad de señal de la muestra de referencia, consistente en individuos control de la misma población y genotipados con el mismo *microarray* (Schaaf et al. 2011; Marshall y Scherer 2012). El incremento en el número y la densidad de marcadores a lo largo del genoma proporcionan a estos paneles un gran poder resolutorio y una elevada eficacia en la detección de pequeñas aberraciones cromosómicas, así como una mayor capacidad definitoria de sus puntos de rotura (Zahir y Marra 2015). Además, su utilización permite la identificación de translocaciones no equilibradas crípticas y la combinación de genotipado de SNPs y detección del número de copias en un único panel posibilita, a su vez, la identificación de regiones con pérdida de heterocigosidad, disomía uniparental, consanguinidad y mosaicismo (Conlin et al. 2010). En este sentido, los paneles de SNPs presentan ventajas adicionales respecto a otros tipos de *microarrays* que únicamente proporcionan información del número de copias.

Actualmente, hay múltiples paneles de CGH y de SNPs disponibles en el mercado con diferentes capacidades resolutorias y coberturas del genoma (Tucker et al. 2011; Rodriguez-

Revenga et al. 2013; Vallespin et al. 2013; D'Amours et al. 2014; de Ligt et al. 2014; Zahir y Marra 2015). En la última década, la aplicación de estos *arrays* de genoma completo está permitiendo la detección de CNVs (tanto microscópicas como submicroscópicas) y la identificación de numerosos síndromes de microdelección/microduplicación que no se conocían previamente (Slavotinek 2008; Vissers y Stankiewicz 2012; Weise et al. 2012; Carvill y Mefford 2013; Watson et al. 2014). La capacidad diagnóstica de estas tecnologías depende de factores como la plataforma y el *array* empleados (la densidad y distribución de las sondas y, en consecuencia, su cobertura del genoma) y del espectro fenotípico de los pacientes (a mayor gravedad del fenotipo, mayor campo diagnóstico, sobre todo si se asocia a dismorfología, anomalías congénitas, DI y epilepsia) (Schaaf et al. 2011; Beaudet 2013) y se sitúa en ~15-20%, incluyendo las anomalías cromosómicas microscópicas a excepción de la trisomía 21, para los trastornos del neurodesarrollo (Zahir y Friedman 2007; Hochstenbach et al. 2009; Sagoo et al. 2009; Miller et al. 2010; Cooper et al. 2011; Hochstenbach et al. 2011). Este hecho justifica su utilización como primera prueba diagnóstica en pacientes con DI/RGD, TEA y/o anomalías congénitas, tal y como se recomienda desde el año 2010 (Miller et al. 2010).

El cariotipado de bandas G y la FISH presentan, no obstante, varias ventajas frente a los *microarrays* cromosómicos, entre las que se incluyen: (1) La localización del material añadido en las ganancias del número de copias es desconocida mediante *microarrays*. (2) El cariotipado de bandas G detecta reordenamientos cromosómicos equilibrados, como inversiones o translocaciones sin variación en el número de copias. Sin embargo, aproximadamente el 40% de las anomalías que aparecen equilibradas por cariotipo son, en realidad, desequilibradas cuando se evalúan con *microarrays* de alta resolución (De Gregori et al. 2007) y Miller y col. (2010), en su evaluación de 33 estudios previos, estimaron que sólo ~0,3% de los pacientes con DI sometidos a análisis convencional presentaban reordenamientos cromosómicos equilibrados siendo, además, difícil de determinar si son causa del fenotipo. Estos autores, sin embargo, sostienen que el cariotipo y la FISH sí son de utilidad para determinar si los padres o familiares de un niño con una translocación desequilibrada son portadores de una translocación equilibrada. De este modo, establecen que la realización del cariotipo convencional sólo se justifica si el paciente presenta un síndrome cromosómico reconocible y detectable por cariotipo (ej. síndrome de Turner, síndrome de Down), historia familiar de reordenamientos cromosómicos o de múltiples pérdidas reproductivas o infertilidad (Miller et al. 2010).

Las tecnologías de secuenciación de nueva generación o NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*), cada vez más ampliamente utilizadas en investigación y en diagnóstico, tienen la capacidad potencial de identificar todos los tipos de variación genética, incluyendo variantes de un único nucleótido o SNVs (del inglés, *Single-Nucleotide Variations*) y pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) y variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (CNVs), en un único ensayo. De forma general, las técnicas de NGS pueden dividirse en: (1) secuenciación del genoma completo o WGS (del inglés, *Whole Genome Sequencing*), (2) secuenciación del exoma completo o WES (del inglés, *Whole Exome Sequencing*), consistente en la captura de la región codificante del genoma (lo que representa ~1-2% del genoma humano) seguida de su secuenciación completa (Hehir-Kwa et al. 2015) y (3) secuenciación de paneles de genes específicos. La secuenciación del genoma completo permite la detección de todas las clases y tamaños de mutaciones, muchas de las cuales podrían haberse perdido por *microarrays* y/o

secuenciación del exoma completo (Jiang et al. 2013; Gilissen et al. 2014; Yuen et al. 2015) y se ha visto que aporta una mayor cobertura media de las regiones codificantes que la secuenciación del exoma (Yuen et al. 2015). No obstante, la aproximación de NGS más utilizada actualmente en investigación y diagnóstico de los trastornos del neurodesarrollo, principalmente debido a su coste comparativamente más reducido y a la mayor disponibilidad de herramientas bioinformáticas de análisis, es la secuenciación de exoma completo (Vissers et al. 2010a; O'Roak et al. 2011; de Ligt et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012; de Ligt et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Sanders et al. 2015; Wright et al. 2015), una aproximación que, además, se ha mostrado más eficaz en la detección de CNVs de pequeño tamaño que las tecnologías de *microarrays* de alta densidad (Krumm et al. 2013; Poultney et al. 2013). Se han desarrollado diferentes métodos de detección de CNVs a partir de datos de NGS que, frecuentemente, se han clasificado en cinco estrategias diferentes: (1) *Read-pair* o *paired-end read mapping* (se basa en que, ante la presencia de una delección, inserción, inversión o translocación, los pares de lecturas o *reads* se alinean al genoma de referencia con una separación u orientación diferente a la esperada), (2) *split read* (emplea el alineamiento de lecturas individuales para la identificación de puntos de rotura de inserciones, delecciones e inversiones asumiendo que, en estas regiones de corte, las lecturas individuales se separan en dos partes que mapean de forma discontinua con el genoma de referencia), (3) profundidad de lectura o *read depth* (parte de la hipótesis de que, si la secuenciación es uniforme, existe una correlación entre el número de lecturas alineadas a una región (profundidad de lectura o cobertura) y el número de copias. Una limitación técnica de esta estrategia es el sesgo en la secuenciación de las plataformas y, concretamente, el sesgo debido al contenido GC de la secuencia, además de las lecturas erróneamente alineadas en regiones altamente repetitivas u homólogas como, por ejemplo, las duplicaciones segmentarias. Por ello, es un método eficaz en la detección de delecciones e inserciones más grandes, puesto que estos sesgos estarían minimizados), (4) *de novo assembly* (el ensamblado *de novo* de pares de *reads* no alineados con la secuencia de referencia puede proporcionar predicciones de variantes estructurales y de nuevas inserciones) y (5) combinación de las aproximaciones anteriores (consultar (Zhao et al. 2013; Tan et al. 2014; Hehir-Kwa et al. 2015; Pirooznia et al. 2015) para una información más detallada de cada estrategia, sus limitaciones y ventajas y herramientas bioinformáticas de análisis). Estos métodos son normalmente complementarios y están especializados en detectar tipos específicos o rangos de tamaños de las variantes estructurales y varían en la precisión para detectar los puntos de rotura (Hehir-Kwa et al. 2015).

La capacidad diagnóstica de las técnicas de detección de CNVs a partir de datos de NGS es dependiente de factores como la plataforma, la estrategia (secuenciación de exoma completo, de genoma completo o de paneles de genes) y el método de análisis empleado, el fenotipo a estudio, así como la selección de los pacientes (por ejemplo, si se incluyen o excluyen muestras analizadas previamente con otras tecnologías). Así, en un estudio reciente con 1.133 pacientes con trastornos del desarrollo (la mayoría previamente analizados por *microarrays*) el campo diagnóstico debido a la detección de CNVs patogénicas a partir de la secuenciación del exoma completo se situó en un 7% (Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015), un valor similar al obtenido, también con datos de exoma, en una gran cohorte de 2.500 individuos con TEA (Iossifov et al. 2014), pero inferior al 21% estimado por Gilissen et al. (2014) para la detección de CNVs por secuenciación del genoma completo en cohortes de DI no pre-seleccionadas (Gilissen et al. 2014).

1.2.3 Genética de la discapacidad intelectual

La base genética de la DI se desconoce en muchos de los pacientes (Ropers 2008; Kaufman et al. 2010; Ropers 2010), con la heterogeneidad genética (que requiere un abordaje del genoma completo para la detección de múltiples tipos de variación genética) y fenotípica como posibles explicaciones. En el año 2010, el consorcio ISCA (*The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium*) recomendó el uso de los paneles de SNPs y de CGH como primera prueba diagnóstica en pacientes con fenotipos como DI/RGD, TEA y anomalías congénitas múltiples (ACM) (Miller et al. 2010), permitiendo la identificación de microdeleciones y microduplicaciones raras como causas genéticas asociadas o factores de susceptibilidad a estos trastornos del neurodesarrollo (Cooper et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Vulto-van Silfhout et al. 2013; Coe et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015). También recientemente, las tecnologías de NGS han favorecido la detección de SNVs, pequeñas *indels* y CNVs implicadas en DI (Hu et al. 2009a; Hu et al. 2009b; Vissers et al. 2010a; Najmabadi et al. 2011; de Ligt et al. 2012; Rauch et al. 2012; de Ligt et al. 2013; Piton et al. 2013; Athanasakis et al. 2014; Coe et al. 2014; Gilissen et al. 2014; Helmsmoortel et al. 2014; Redin et al. 2014; Vergult et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Hu et al. 2015; Niranjana et al. 2015; Wright et al. 2015).

1.2.3.1 Síndromes genéticos con DI

La identificación de las causas genéticas de las formas sindrómicas de DI resultó, inicialmente, más exitosa que la de las formas no sindrómicas, gracias a la disponibilidad de múltiples pacientes y familias con fenotipos reconocibles para estudios de genética molecular. Algunos de los síndromes con causa genética conocida que incluyen DI entre sus rasgos fenotípicos son, entre otros, el síndrome del X frágil (SXF; OMIM 300624), el síndrome de Rett (RTT; OMIM 312750), el síndrome de Angelman (AS; OMIM 105830), el síndrome de Prader-Willi (PWS; OMIM 176270), el síndrome de Rubinstein-Taybi (RSTS1; OMIM 180849), la esclerosis tuberosa (TSC1; OMIM 191100 y TSC2; OMIM 613254), la neurofibromatosis tipo 1 (NF1; OMIM 162200), la distrofia muscular de Duchenne (DMD; OMIM 310200) y el síndrome de Noonan (NS1; OMIM 163950).

También algunos defectos congénitos del metabolismo, como la fenilcetonuria o el hipotiroidismo, se han asociado con frecuencia a DI (Ropers 2010; Iqbal y van Bokhoven 2014). La mayoría de estos trastornos metabólicos presentan herencia autosómica recesiva, aunque algunos de los más frecuentes están ligados al cromosoma X recesivos (Ropers 2010), y se ha encontrado que, globalmente, suponen ~1-3% de la DI inexplicada (Engbers et al. 2008; Willemsen y Kleefstra 2013). No obstante, algunos de los rasgos clínicos de estos trastornos pueden prevenirse y los países desarrollados cuentan con programas específicos de detección temprana y tratamiento de los mismos.

1.2.3.2 Aberraciones cromosómicas microscópicas en DI

Clásicamente, las anomalías cromosómicas visibles citogenéticamente explicaban, en su conjunto, ~10-15% de los pacientes con DI grave, siendo ~2/3 de estos casos debidos a la trisomía 21, causante del síndrome de Down (Leonard y Wen 2002; Rauch et al. 2006; Ropers

2008; Ropers 2010; Mefford et al. 2012), mientras que el tercio restante se atribuía a alteraciones cromosómicas mucho menos frecuentes, como translocaciones (normalmente desequilibradas), inversiones, grandes deleciones y duplicaciones (típicamente de tamaño > 5-10 Mb) y cromosomas marcadores supernumerarios (Ellison et al. 2013). El desarrollo de la FISH en los años 80 y su aplicación diagnóstica permitió la detección de reordenamientos cromosómicos más pequeños y la confirmación de diagnósticos de pacientes con sospecha de síndromes de microdelección o microduplicación concretos. Algunos de estos trastornos genómicos, también clásicamente estudiados por técnicas de citogenética convencional (cariotipado y FISH principalmente), incluyen el AS/PWS (causados, mayoritariamente, por deleciones de la región 15q11.2q13 en el cromosoma de origen materno/paterno; OMIM 105830 y 176270, respectivamente), el síndrome de Williams-Beuren (WBS; deleción 7q11.23; OMIM 194050), el síndrome de Smith-Magenis (SMS; deleción 17q11.2; OMIM 182290), el síndrome de DiGeorge/velocardiofacial (DGS/VCFS; deleción 22q11.21; OMIM 188400, 192430) y la monosomía 1p36 (OMIM 607872), entre otros. Algunos de estos desequilibrios son bastante comunes, como la deleción 1p36 (OMIM 607872), que se ha identificado en ~1% de los pacientes con DI idiopática (Battaglia et al. 2008). Además, el estudio de las deleciones y duplicaciones subteloméricas mediante FISH o MLPA permitía explicar ~2,5-5% de la DI previamente inexplicada [revisado por (Miller et al. 2010; Mefford et al. 2012)], tal y como ha sido recientemente confirmado (Santa Maria et al. 2015).

Aunque el cariotipado convencional y la FISH presentan ventajas en ciertas circunstancias concretas (por ejemplo, permiten localizar el material añadido en las ganancias del número de copias e identificar reordenamientos cromosómicos equilibrados, como inversiones o translocaciones sin variación en el número de copias), la tendencia actual en los laboratorios de genética molecular es a la utilización de los paneles de CGH y de SNPs para la detección de CNVs y de técnicas de NGS para la identificación de SNVs, *indels* y CNVs (ver subapartados 1.2.3.3 y 1.2.3.4).

1.2.3.3 Variantes del número de copias en DI

La recomendación, por parte del consorcio ISCA, del uso de los paneles cromosómicos como primera prueba diagnóstica en pacientes con DI/RGD, TEA y ACM (Miller et al. 2010) ha permitido la identificación de microdeleciones y microduplicaciones raras como causas genéticas asociadas o factores de susceptibilidad a estos trastornos del neurodesarrollo (Cooper et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Vultovan Silfhout et al. 2013; Coe et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015):

En el año 2011, Cooper y col. analizaron 15.767 pacientes con DI/RGD y ACM y 8.329 individuos control y estimaron que ~14,2% del fenotipo de sus pacientes estaba causado por CNVs de tamaño > 400 kb. Este estudio, además, proporcionó evidencias de patogenicidad para 59 regiones genómicas -como la deleción 15q11.2 y las duplicaciones 16p11.2 y 15q13.3-, ayudó a refinar el intervalo crítico de varios trastornos genómicos -incluyendo el síndrome de la microdelección 17q21.31- y mostró concordancia entre la gravedad fenotípica y la carga de CNVs largas. En este sentido, examinaron la distribución del tamaño de estas variantes en los diferentes subfenotipos encontrando que la carga de CNVs largas estaba incrementada en los fenotipos del neurodesarrollo más graves (por ejemplo, los niños con anomalías craneofaciales y defectos cardíacos estructurales congénitos presentaban una carga

mayor de CNVs largas que los pacientes con epilepsia y TEA). Finalmente, este trabajo permitió identificar 615 genes delecionados y 325 genes duplicados significativamente enriquecidos en casos en relación a los controles; algunos de ellos ya habían sido considerados genes candidatos y otros suponían nuevas asociaciones potenciales (Cooper et al. 2011).

Ese mismo año, Kaminsky y col. (2011) analizaron 14 regiones de CNVs recurrentes (región 1q21 de Thrombocytopenia-absent radius (TAR), 1q21.1 distal, 3q29, 5q35, 7q11.23, 8p23.1, 15q11.2q13, 15q13, 16p13.11, 16p11.2, 17p11.2, 17q12, 17q21.31 y 22q11.2) en 15.749 pacientes de laboratorios clínicos pertenecientes al consorcio ISCA (DI/RGD, rasgos dismórficos, ACM, TEA y otros rasgos clínicos indicativos de un trastorno genómico) y 10.118 controles y encontraron que la capacidad diagnóstica de estas pruebas fue del 14,7%. De las 14 regiones estudiadas, todas las deleciones y 7 de las ganancias (1q21.1, 7q11.23, 15q11.2q13, 16p11.2, 17p11.2, 17q12 y 22q11.2) recurrentes se encontraron significativamente enriquecidas en casos en relación con controles; las restantes duplicaciones fueron clasificadas, provisionalmente, como variantes de significado clínico incierto a la espera de ser estudiadas en cohortes de mayor tamaño y mejor definidas clínicamente (Kaminsky et al. 2011).

Por su parte, Girirajan y col. (2011) utilizaron un panel de SNPs a medida, enriquecido en puntos calientes genómicos, para la detección de CNVs y analizaron 1.227 individuos con diferentes fenotipos -dislexia (n = 376), autismo esporádico (n = 350) y DI (n = 501)- y 337 controles. Inicialmente analizaron la carga de CNVs largas (> 1 Mb) en los fenotipos del neurodesarrollo y en controles, encontrando los siguientes resultados: (1) La frecuencia de estas CNVs fue significativamente mayor en DI o autismo en comparación con controles, mientras que la carga de estas CNVs en dislexia era similar a controles. (2) Entre los fenotipos del neurodesarrollo, la carga de CNVs largas fue significativamente mayor en DI que en autismo o dislexia. (3) Las CNVs largas fueron significativamente más abundantes en pacientes con DI y ACM que en pacientes con DI sin malformaciones congénitas. (4) Aunque no alcanzó nivel de significación estadística, la carga de este tipo de CNVs fue también mayor en autismo con DI que en autismo sin DI y (5) La proporción de genes con número de copia alterada y la densidad génica media por CNV fueron mayores en los pacientes con DI y ACM en comparación con pacientes que sólo presentaban DI o autismo. Como los propios autores consideran, estos hallazgos sugieren una correlación positiva entre la gravedad del fenotipo y el tamaño y la densidad génica de las CNVs. Por otro lado, cuando el análisis se restringió a variantes raras y > 50 kb encontraron: (1) Diferencia en la frecuencia de las CNVs raras en DI (16%) y autismo (10%) en comparación con dislexia (2%), que presentaba una frecuencia similar a controles. (2) Las CNVs raras tendían a ser *de novo* en DI (64%) en comparación con autismo (40%) o dislexia (0%). En este sentido, los autores sugieren que estos resultados reflejarían una tendencia general al aumento de la tasas *de novo* con el incremento de la gravedad del trastorno (Girirajan et al. 2011).

En un estudio posterior con 2.312 niños portadores de 72 CNVs conocidas por su asociación con DI/ACM, Girirajan y col. (2012) pudieron evaluar el patrón de herencia de 653 pacientes (que colectivamente portaban 66 de esas 72 CNVs estudiadas) y encontraron que 18/66 variantes eran *de novo* y principalmente asociadas con trastornos sindrómicos clínicamente reconocibles, mientras que las restantes 48/66 fueron heredadas de uno de los progenitores e incluían CNVs asociadas a manifestaciones fenotípicas más variables y cuyo significado clínico, aunque potencialmente patogénico, era incierto (Girirajan et al. 2012).

Vulto-van Silfhout y col. (2013) estudiaron la implicación clínica de las CNVs raras *de novo* y heredadas en 5.531 pacientes con DI/ACM. Para ello, utilizaron el panel 250K Nsp de Affymetrix y detectaron un total de 1.663 CNVs raras (437 *de novo*, 638 heredadas y 588 de herencia indeterminada) en 1.338 pacientes (25,1%; rango de 0-5 CNVs/paciente). Clasificaron el 69,3% de estas CNVs como patogénicas, mientras que el 30,7% restante se consideraron neutras. Los hallazgos más relevantes de este trabajo fueron los siguientes: (1) Las CNVs *de novo* tuvieron un tamaño significativamente superior al de las CNVs heredadas. (2) Las deleciones fueron más frecuentemente *de novo* (52,5%) que las ganancias (28,7%). (3) Las CNVs heredadas fueron más frecuentemente de origen materno (56,5%) que paterno (43,5%). (4) El porcentaje de CNVs clasificadas como benignas varió con el patrón de herencia (un 17,6% de las CNVs *de novo* fueron consideradas neutras frente al 42,6% de las CNVs heredadas). (5) Tanto el contenido como la densidad de genes fue mayor en las CNVs *de novo* que en las heredadas. (6) Los genes en deleciones *de novo* estuvieron enriquecidos en genes haploinsuficientes conocidos (no obstante, este enriquecimiento se perdió al eliminar del análisis los trastornos genómicos mediados por LCRs, indicando que estas CNVs recurrentes estarían enriquecidas en genes haploinsuficientes conocidos), mientras que no se observó dicho enriquecimiento en CNVs heredadas ni en ganancias *de novo*. (7) Identificaron 20 CNVs *de novo* o heredadas en homocigosis que afectaban a genes únicos, algunos de ellos previamente propuestos como genes candidatos [*ANKH* (OMIM 605145) y *ZFH4* (OMIM 606940)] o asociados con síndromes de DI [*TCF4* (OMIM 602272), implicado en el síndrome de Pitt-Hopkins (OMIM 610954); *SMARCA2* (OMIM 600014), asociado al síndrome Nicolaides-Baraitser (OMIM 601358) e *ISPD* (OMIM 614631), implicado en el síndrome de Walker-Warburg (OMIM 614643)]; mientras que otros representaron potenciales nuevos genes de DI/ACM [*DLG2* (OMIM 603583), *MPP7* (OMIM 610973), *CEP89*, *TRIO* (OMIM 601893), *ASTN2* (OMIM 612856) y *PIK3C3* (OMIM 602609)]. Finalmente, el análisis de la correlación genotipo-fenotipo permitió evidenciar que: (1) Los pacientes con fenotipos graves (incluyendo malformaciones de órganos) tuvieron más CNVs *de novo*, mientras que los pacientes con fenotipos más leves (como dismorfismo facial) estuvieron enriquecidos tanto en CNVs *de novo* como heredadas. (2) El tamaño y especialmente el número de genes afectados por las CNVs mostraron una correlación positiva con la gravedad de los fenotipos de los pacientes; una correlación dirigida por las CNVs *de novo* y que no se cumplió con las CNVs heredadas. (3) Los pacientes con múltiples CNVs presentaron un fenotipo significativamente más grave que los que portaban una única CNV (Vulto-van Silfhout et al. 2013).

Por su parte, Coe y col. (2014) analizaron datos de paneles de CGH de 29.085 niños con DI/RGD y/o TEA y 19.584 controles adultos y encontraron los siguientes resultados: (1) Las CNVs raras estaban incrementadas en casos frente a controles, principalmente debido a las deleciones (OR para deleciones ≥ 500 kb = 5,09 *versus* OR para duplicaciones = 1,76). (2) Las CNVs potencialmente deletéreas se transmitieron preferencialmente de las madres. (3) Identificaron 2.184 CNVs en 55 regiones conocidas por su asociación con trastornos genómicos autosómicos (Coe et al. 2014).

El hecho de que la DI afecte significativamente más a varones que a mujeres ha propiciado la búsqueda de variantes genéticas en el cromosoma X. En este sentido, diversos autores han aplicado las técnicas de CGH y de paneles de SNPs para la detección de CNVs ligadas al X (LX), tanto con paneles de genoma completo como con paneles del cromosoma X, en pacientes con DI (Bauters et al. 2005; Froyen et al. 2007; Madrigal et al. 2007; Whibley et al. 2010; Isrie et al. 2012; Willemsen et al. 2012a; Mignon-Ravix et al. 2014).

Las tecnologías de NGS, cada vez más utilizadas en los laboratorios de genética médica, también están favoreciendo la detección de CNVs implicadas en DI (de Ligt et al. 2013; Gilissen et al. 2014; Vergult et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015). De Ligt y col. (2013) publicaron uno de los primeros trabajos en los que se evaluaba la capacidad de estas tecnologías para detectar CNVs clínicamente relevantes en pacientes con DI. Estos autores compararon los resultados de la WES de 10 pacientes con DI con datos previos de paneles de SNPs de alta resolución (paneles Affymetrix 250K NspI y Cytogenomics 2.7M) y encontraron que el 88% de las CNVs codificantes raras que contenían 3 ó más exones pudieron ser también identificadas mediante NGS (de Ligt et al. 2013). Posteriormente, Vergult y col. (2014) compararon los resultados de cariotipado convencional y paneles de CGH *versus* datos de NGS en una cohorte pre-seleccionada de 50 pacientes con DI/ACM (21 pacientes con deleciones o duplicaciones, 6 pacientes con una alteración cromosómica aparentemente equilibrada, 3 pacientes con reordenamientos complejos y 20 pacientes sin aberraciones causales). En este estudio, la secuenciación permitió identificar el total de las aberraciones previamente detectadas, con la única excepción de una translocación equilibrada de un brazo cromosómico completo detectado por cariotipo. Además, pudieron delimitar mejor los puntos de rotura de las alteraciones equilibradas y desequilibradas complejas detectadas previamente y proponer el gen causal o candidato en algunos de los pacientes (ej. *NRXN3*, *MAP3K9*) (Vergult et al. 2014). Recientemente, se ha estimado que la capacidad diagnóstica de las CNVs detectadas a partir de datos de NGS se situaría en el 7% para la WES en pacientes con trastornos del desarrollo graves (87% de ellos con DI) no diagnosticados (previamente analizados con *microarrays*) (Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015) y en un 21% para la WGS en cohortes no pre-seleccionadas de DI (Gilissen et al. 2014).

1.2.3.3.1 Expresividad variable y penetrancia incompleta

Dentro de los trastornos de microdelección/microduplicación recurrentes podríamos distinguir: (1) Formas sindrómicas asociadas a fenotipos bien caracterizados y prácticamente invariables, altamente penetrantes (es decir, (prácticamente) todos los portadores de la variante manifiestan el fenotipo) y principalmente *de novo* en origen y (2) trastornos genómicos con extrema variabilidad fenotípica y penetrancia incompleta (es decir, una misma CNV puede generar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde portadores asintomáticos a diferentes trastornos del neurodesarrollo y/o psiquiátricos) (Girirajan y Eichler 2010), que pueden presentarse *de novo* pero, principalmente, son heredados de un progenitor no afecto (o con fenotipos leves/subclínicos) (Girirajan et al. 2012). Algunos ejemplos dentro del primer grupo serían el síndrome de Sotos (causado por la microdelección 5q35; OMIM 117550), el síndrome de Williams-Beuren (microdelección 7q11.23; OMIM 194050), el síndrome de Smith-Magenis (microdelección 17p11.2; OMIM 182290), el síndrome de Potocki-Lupski (microduplicación 17p11.2; OMIM 610883) y el síndrome de DiGeorge/velocardiofacial (microdelección 22q11.21; OMIM 188400, 192430), entre otros. En el segundo grupo se incluirían, por ejemplo, microdeleciones y/o microduplicaciones en las regiones cromosómicas 1q21.1 (OMIM 612474 y 612475), 3q29 (OMIM 609425 y 611936), 15q13.3 [OMIM 612001 y (Girirajan et al. 2012)], 16p13.11 (Girirajan et al. 2012; Rosenfeld et al. 2012), 16p12.1 [OMIM 136570 y (Girirajan et al. 2012)], 16p11.2 distal (Rosenfeld et al. 2012), 16p11.2 (OMIM 611913 y 614671), 17p13.3 (*YWHAE*) (Girirajan et al. 2012) y 17q12 (OMIM 614527 y 614526), microduplicaciones 7q11.23 (recíproca del síndrome de Williams-Beuren; OMIM 609757), 15q11.2 (región del síndrome de Prader-Willi) (Girirajan

et al. 2012), 22q11.21 (recíproca del síndrome de DiGeorge/velocardiofacial; OMIM 608363) y 22q11.21 distal (Girirajan et al. 2012) y microdeleciones 15q11.2 (OMIM 615656), 15q13.3 (OMIM 612001) y 16p13.3 [región Rubinstein-Taiby; (Girirajan et al. 2012)]. El espectro fenotípico al que han sido asociados estos trastornos genómicos clínicamente variables incluyen desde fenotipos normales hasta, entre otros, afectación del lenguaje y del habla y dificultades de aprendizaje, problemas motores, DI/RGD, dismorfismo facial, ACM, TEA, TDAH y otros problemas del comportamiento, problemas neurológicos (epilepsia y/o convulsiones) y/o trastornos psiquiátricos de inicio en la edad adulta (esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión recurrente) (Girirajan y Eichler 2010).

Las estimas de penetrancia de estas CNVs recurrentes en relación a los fenotipos del neurodesarrollo (DI/RGD, ACM y TEA) y psiquiátricos (esquizofrenia) han sido calculadas por diversos autores y pueden ser consultadas en las publicaciones correspondientes (Vassos et al. 2010; Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013).

1.2.3.3.2 Causas de la expresividad variable y/o la penetrancia incompleta

Las causas de la extrema heterogeneidad clínica asociada a los trastornos genómicos recurrentes no están claras, pero una explicación plausible y frecuentemente propuesta incluye factores genéticos adicionales como potenciales desencadenantes o modificadores del fenotipo, una hipótesis de múltiple evento propuesta inicialmente por Girirajan y col. (2010). Estos autores mostraron evidencias de asociación significativa entre la microdelección recurrente 16p12.1 de 520 kb y el retraso del desarrollo en la infancia, así como la existencia de un enriquecimiento significativo en segundas CNVs en los pacientes portadores de la delección (10/42; 24%) comparado con los controles (21/471; 4,4%). En los pacientes en los que el segundo evento CNV estuvo asociado con un síndrome conocido, los rasgos clínicos de los portadores de dos mutaciones fueron distintas y/o más graves que las típicamente asociadas al síndrome. Por otro lado, la mayoría de las delecciones 16p12.1 fueron heredadas de padres portadores que, además, tendían a presentar más fenotipos neuropsiquiátricos (dificultades de aprendizaje, depresión, trastorno bipolar o convulsiones) que los padres no portadores. Finalmente, también corroboraron que los pacientes índice manifestaban rasgos clínicos más graves (afectación del habla y problemas motores, dismorfología facial y anomalías de órganos sistémicos) que sus padres portadores. Así, propusieron que la delección 16p12.1 sería un factor de riesgo significativo de DI que actuaría en combinación con un segundo evento (potencialmente otra CNV, una SNV o un evento ambiental) modificador del fenotipo, explicando la aparición de manifestaciones clínicas más graves y la comorbilidad significativa existente entre DI, esquizofrenia y autismo o la variabilidad subyacente documentada para varias de las CNVs recurrentes (Girirajan et al. 2010). Trabajos posteriores han mostrado evidencias que apoyan este modelo (Girirajan et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Vulto-van Silfhout et al. 2013). Así, en su cohorte de 1.227 individuos (dislexia, autismo y DI), estos mismos autores detectaron que el 11,6% de los pacientes con DI presentaban más de una CNV rara larga y que, además, todos ellos manifestaban rasgos clínicos graves. Además, constataron diferencias entre las tasas de CNVs múltiples entre pacientes con DI y ACM (44%) y los pacientes con DI sin ACM (6,7%) y que sólo el 2,9% de los pacientes con autismo y ninguno de los pacientes con dislexia presentaban CNVs múltiples. Una vez más, sugieren que la gravedad de los fenotipos podría estar influenciada por la presencia de múltiples CNVs largas co-ocurriendo en el mismo individuo (Girirajan et al. 2011). Con la intención de conocer las causas de la expresividad variable de algunas CNVs raras y de examinar la relación entre la gravedad fenotípica y el tamaño y el número total de dichas

variantes, estos mismos autores analizaron 2.312 niños portadores de CNVs conocidas por su asociación con DI/ACM. Los resultados en relación al modelo de múltiple evento derivados de este estudio son los siguientes: (1) Un 8,7% de los pacientes con una primera CNV portaban al menos una segunda CNV autosómica grande. (2) Los trastornos genómicos con extrema heterogeneidad fenotípica pudieron distinguirse de los sindrómicos en base al número total de CNVs [con un enriquecimiento significativo de segundos eventos CNV en los trastornos genómicos fenotípicamente variables en comparación con los sindrómicos (156 de 1509 ó 10,3% vs. 44 de 857 ó 5,1%)] y al patrón de herencia de dichas variantes (con un incremento significativo en la proporción de primeros eventos CNV heredadas en trastornos con variación fenotípica en comparación con los sindrómicos y con una correlación positiva entre el porcentaje de niños portadores de primeros eventos CNV heredados y la proporción de niños portadores de una segunda CNV). (3) La presencia de dos CNVs largas de significado clínico incierto fue 8 veces más probable en pacientes que en controles. (4) Identificaron 7 trastornos genómicos (delección 15q11.2, duplicación 16p11.2, delección 16p12.1, duplicación 16p11.2 distal, duplicación 3q29, duplicación 17p13.3 y delección 15q23q24) de los 72 evaluados para los cuales los afectos presentaban mayor probabilidad de portar múltiples CNVs en comparación con controles. (5) No encontraron desviación parental en el patrón de herencia del primer evento CNV mientras que los segundos eventos CNV fueron preferentemente transmitidos por madres portadoras. (6) Entre los pacientes con el mismo trastorno genómico, aquellos con múltiples CNVs tuvieron déficits en más dominios que aquellos con una única CNV. Además, estudiando pacientes con autismo de la *Simons Simplex Collection* (SSC) encontraron una fuerte asociación entre el cociente intelectual medio y el número de genes afectados por variantes raras. También evaluaron la presencia de múltiples CNVs grandes autosómicas en casos índice de esta colección de muestras (n = 841) y sus hermanos (n = 793) y encontraron que, aunque sólo 6 niños portaron más de una CNV larga, 5 de ellos estuvieron entre los más gravemente afectados, sugiriendo una correlación entre la gravedad y la carga de variantes (Girirajan et al. 2012). También Vulto-van Silfhout y col. (2013), en su estudio de 5.531 pacientes con DI/ACM, encontraron que un 17,4% de los pacientes con CNVs portaban múltiples eventos (517 CNVs en total, rango 2-5 por muestra) y que dichos pacientes presentaban un fenotipo más grave que aquellos con una única variante, apuntando nuevamente a un efecto combinatorio de las CNVs adicionales en la definición del fenotipo (Vulto-van Silfhout et al. 2013). Además de estos estudios con grandes cohortes de pacientes, existen ejemplos en la literatura médica de pacientes con fenotipos del neurodesarrollo que se han explicado con este modelo de doble (múltiple) evento (Fullston et al. 2011; Tassano et al. 2015), de forma que se ha propuesto que la WES estaría también justificada en pacientes portadores de microdelecciones o microduplicaciones con rasgos inexplicados o microdesequilibrios heredados de padres no afectados (Classen et al. 2013). La frecuencia de segundos eventos CNV en portadores de CNVs en 11 loci recurrentes diferentes ha sido calculada por Kirov y col. (2013) sobre una cohorte inicial de 13.465 casos (RGD/TEA/ACM y esquizofrenia) y 17.873 controles (Kirov et al. 2013).

Explicaciones alternativas o complementarias de la expresividad variable y/o de la penetrancia incompleta de algunos de estos trastornos genómicos recurrentes (y que también podrían aplicarse a algunas alteraciones no recurrentes) incluyen: (1) El fenotipo podría pasar desapercibido en controles o en familiares si se presenta clínicamente atenuado (Liu et al. 2011), si mejora con la edad o si se expresa más tardíamente. Así, por ejemplo, Stefansson y col. (2013) estudiaron controles (a partir de una muestra inicial de 101.655 individuos genotipados de Islandia) portadores de CNVs recurrentes que confieren riesgo a autismo y/o

esquizofrenia y encontraron que la fertilidad estaba significativamente reducida en los portadores de la delección 16p11.2 y de la duplicación 22q11.21 y significativamente aumentada en los portadores de la delección 16p12.1. Por otro lado, la función cognitiva de los controles portadores se situaba entre la de los pacientes con esquizofrenia y la de la población control. Además, aquellos controles portadores de la delección recurrente 15q11.2 entre los puntos de rotura BP1 y BP2 tenían historia de dislexia y discalculalia (Stefansson et al. 2013).

(2) Diferencias en las frecuencias poblacionales de la CNV (Girirajan y Eichler 2010) como ha sido sugerido, por ejemplo, para las ganancias de significado clínico incierto en la región cromosómica Xp22.31 (Li et al. 2010; Liu et al. 2011) o de las delecciones 15q11.2 (De Wolf et al. 2013).

(3) Diferencias en tamaño, localización y contenido genómico de la CNV (Girirajan y Eichler 2010; Carvill y Mefford 2013). Por ejemplo, aunque el tamaño más frecuente de las CNVs 16p13.11 recurrentes es aproximadamente 1,3-1,6 Mb (Ullmann et al. 2007; Hannes et al. 2009; Nagamani et al. 2010; Ramalingam et al. 2011), también se han encontrado reordenamientos atípicos (Hannes et al. 2009; Nagamani et al. 2010; Ramalingam et al. 2011).

(4) Existencia de un efecto de desviación de género. Por ejemplo, Tropeano y col. (2013) encontraron un enriquecimiento significativo de CNVs 16p13.11 recurrentes sólo en pacientes varones, pero no en mujeres, comparado con controles (Tropeano et al. 2013).

(5) Para las microdelecciones, desenmascaramiento de mutaciones en genes recesivos en el alelo no delecionado (Girirajan y Eichler 2010; Boone et al. 2013; Carvill y Mefford 2013; Hehir-Kwa et al. 2013) con algunas evidencias en la literatura médica que confirman esta posibilidad (Hochstenbach et al. 2012; McDonald-McGinn et al. 2013; Paciorkowski et al. 2013).

(6) Inactivación desviada del X, para las CNVs identificadas en este cromosoma (Hehir-Kwa et al. 2013). Aunque con discrepancias entre autores, esta posibilidad se ha propuesto para explicar la expresividad variable y la penetrancia incompleta de las ganancias Xp22.31 (Li et al. 2010; Liu et al. 2011).

1.2.3.4 Variantes de un único nucleótido en DI

La capacidad de los paneles de SNPs y de CGH de alta resolución para detectar CNVs cada vez más pequeñas ha permitido incrementar el número de genes candidatos o asociados a fenotipos del neurodesarrollo (Mikhail et al. 2011). No obstante, muchas de las CNVs implicadas en los trastornos del neurodesarrollo son largas y abarcan múltiples genes, dificultando la correlación genotipo-fenotipo. A pesar de esto, algunos autores han desarrollado estrategias y aproximaciones que han permitido la identificación de genes específicos asociados con DI/RGD:

La estrategia de secuenciación convencional de genes candidatos ha permitido la identificación de causas de DI, entre las que se incluyen *SYNGAP1* (OMIM 603384), *STXBPI* (OMIM 602926), *SHANK3* (OMIM 606230), *GRIA3* (OMIM 305915), *GRIK2* (OMIM 138244), *GRIN2A* (OMIM 138253) y *GRIN2B* (OMIM 138252). Hamdan y col. (2011) secuenciaron 197 genes de complejos de receptores de glutamato sinápticos (enriquecidos en proteínas implicadas en plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria) en 95 pacientes con DI no sindrómica esporádicos y encontraron: (1) Un total de 11 mutaciones *de novo* (10 potencialmente deletéreas y 1 silente) en 8 genes diferentes (incluyendo *SYNGAP1*, *STXBPI* y *SHANK3*), que no se encontraron en 285 controles sanos. (2) Enriquecimiento significativo de las variantes *de novo* funcionales (no sinónimas y de *splicing*) vs. las neutras (intrónicas no *splicing*, sinónimas) en la cohorte de DI no sindrómica (Hamdan et al. 2011).

También se han identificado genes candidatos de DI mediante análisis de alteraciones cromosómicas y secuenciación convencional de sus puntos de rotura incluyendo, entre otros, *DOCK8* (OMIM 611432), *MBD5* (OMIM 611472), *CDH15* (OMIM 114019), *KIRREL3* (OMIM 607761) (autosómicos) y *TSPAN7* (OMIM 300096) (ligado al cromosoma X) (Zemni et al. 2000; Wagenstaller et al. 2007; Bhalla et al. 2008; Griggs et al. 2008). Más recientemente, esta estrategia de secuenciación de puntos de rotura se ha aplicado, con técnicas de nueva generación, a aberraciones cromosómicas aparentemente equilibradas de pacientes con autismo o trastornos del neurodesarrollo relacionados, llevando a la identificación de 33 loci alterados que incluyeron: (a) genes previamente asociados con trastornos del neurodesarrollo (ej. *AUTS2*, *FOXP1* y *CDKL5*), (b) genes únicos que contribuyen a síndromes de microdelección conocidos (ej. *MBD5*, *SATB2*, *EHMT1* y *SNURF-SNRPN*), (c) nuevos loci de riesgo (ej. *CHD8*, *KIRREL3* y *ZNF507*) y (d) genes asociados con trastornos psiquiátricos de inicio tardío (ej. *TCF4*, *ZNF804A*, *PDE10A*, *GRIN2B* y *ANK3*) (Talkowski et al. 2012).

Algunos de estos genes (ej. *CDKL5*, *STXBPI*, *SYNGAPI* y *GRIN2A*) relacionados con DI, están también implicados en fenotipos de epilepsia refractaria, lo cual da soporte etiológico a la elevada comorbilidad con epilepsia en pacientes con DI (Mastrangelo y Leuzzi 2012; Mastrangelo 2015; Allen et al. 2016).

La reciente implementación de las técnicas de NGS en investigación y diagnóstico, con el potencial para identificar variantes causales de enfermedad a lo largo del exoma (o genoma) completo y a nivel de pb, está permitiendo una nueva revolución en el estudio de los trastornos del neurodesarrollo. Varios estudios han demostrado la efectividad de estas técnicas, tanto de la secuenciación de genes candidatos (Coe et al. 2014; Redin et al. 2014) como del exoma o el genoma completo (Vissers et al. 2010a; de Ligt et al. 2012; Rauch et al. 2012; Athanasakis et al. 2014; Gilissen et al. 2014; Helmsmoortel et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015), en la identificación de pequeñas *indels* y SNVs en genes de DI:

Así, el análisis de 217 genes candidato de DI y autismo en 106 pacientes con DI de etiología desconocida y negativos para paneles de CGH llevó a la identificación de 26 variantes causales (capacidad diagnóstica del 25%), incluyendo 16 en 13 genes ligados al cromosoma X (*ATRX*, *CUL4B*, *DMD*, *FMR1*, *HCFC1*, *IL1RAPL1*, *IQSEC2*, *KDM5C*, *MAOA*, *MECP2*, *SLC9A6*, *SLC16A2* y *PHF8*) y 10 mutaciones *de novo* en 8 genes autosómicos dominantes (*DYRK1A*, *GRIN1*, *MED13L*, *TCF4*, *RAI1*, *SHANK3*, *SLC2A1* y *SYNGAPI*) (Redin et al. 2014). Ese mismo año, Coe y col. (2014) integraron sus datos de genotipado de CNVs en 29.085 en niños con retraso del desarrollo y 19.584 controles (mencionados en el apartado anterior) con datos de WES de TEA, DI, defectos cardíacos congénitos y esquizofrenia y seleccionaron 26 genes candidatos que resecuenciaron en 4.716 casos adicionales con DI/RGD (n = 3.387) o TEA (n = 1.329). Comparando estos datos con los de resecuenciación de 2.193 hermanos no afectados de la *Simons Simplex Collection* (SSC) y del ESP6500 e integrándolos con los datos de CNVs, encontraron 10 genes enriquecidos en variantes con potencial pérdida de función (*ADNP*, *DYRK1A*, *NRXN1*, *NRG3*, *SETBP1*, *ZMYND11*, *DNM3*, *CYFIP1*, *FOXP1* y *SCN2A*) (Coe et al. 2014).

Uno de los primeros trabajos en utilizar la estrategia de WES se trató de un estudio basado en familias para verificar la hipótesis de que las SNVs *de novo* podrían explicar una fracción importante de las causas de DI. Para ello, se secuenciaron los exomas de 10 tríos (caso índice y sus padres no afectados) con DI inexplicada moderada-grave, historia familiar

negativa para trastornos mentales y resultados normales en cariotipo, test de X-frágil y paneles cromosómicos, encontrándose los siguientes resultados: (1) Identificación y validación de 9 mutaciones *de novo* no sinónimas únicas en 9 genes; 8 de estas mutaciones *de novo* se encontraron en estado heterocigoto en autosomas y 1 en estado hemocigoto en el cromosoma X. Ninguna de estas mutaciones se identificó en 1.664 controles ni tampoco se detectaron mutaciones adicionales posiblemente patogénicas en esos mismos genes en los controles. (2) Seis de las 9 SNVs *de novo*, encontradas en 6 pacientes diferentes, se consideraron probablemente patogénicas en base a su función génica, conservación evolutiva e impacto de la mutación. De este modo, los autores concluyen que, conjuntamente con las CNVs *de novo*, las SNVs *de novo* de gran efecto podrían explicar la mayoría de los casos de DI en la población (Vissers et al. 2010a). Trabajos posteriores han encontrado mutaciones en algunos de los genes candidatos propuestos por estos investigadores en pacientes con DI, como es el caso de *DYNCH1* (Weedon et al. 2011; de Ligt et al. 2012; Willemsen et al. 2012b) y *DEAF1* (Vulto-van Silfhout et al. 2014; Walzl 2014).

Por su parte, de Ligt y col. (2012) también secuenciaron el exoma de más de 21.000 genes en 100 trios de DI en búsqueda de mutaciones causales *de novo*, autosómicas recesivas (AR) y LX. En este trabajo, identificaron un total de 79 mutaciones *de novo* en 53 de los 100 pacientes y 13 de ellas (10 *de novo* y 3 LX y heredadas de la madre), encontradas en pacientes diferentes, fueron en genes conocidos de DI y de predicción patogénica. Además, encontraron mutaciones *de novo* potencialmente causales en nuevos genes candidato de DI en 22 pacientes; para 3 de estos genes (*DYNCH1*, *GATAD2B* y *CTNNA1*) se identificaron mutaciones adicionales *de novo* en una serie de confirmación compuesta por 765 pacientes adicionales con fenotipos similares. Por otro lado, tres mutaciones *de novo* afectaron a genes de DI-AR; en dos de ellos (*ARFGAP2* y *TUSC3*) no detectaron una segunda mutación heredada, en cambio en otro (*LRP2*) identificaron una segunda variante, heredada del padre, de predicción patogénica. En este sentido, sugieren que la forma AR de DI es rara en pacientes con DI de padres no consanguíneos. Además, aunque el análisis de causas heredadas de DI-AR reveló mutaciones heredadas bialélicas en 9 genes, ninguna de ellas fue clasificada como causa posible de DI. Finalmente, detectaron 14 mutaciones heredadas LX en 12 pacientes varones: 3 fueron en genes conocidos de DI-LX (1 en *PDHA1* y 2 en *ARHGAP9*), de predicción patogénica y los fenotipos coincidentes con los de pacientes descritos previamente, mientras que las 11 SNVs restantes, detectadas en 10 pacientes varones, se identificaron en genes no asociados previamente a DI (entre estos, *TRPC5* fue clasificado como posiblemente causal). Globalmente, por tanto, el campo diagnóstico de la WES en estos 100 pacientes se situó en un 16% e implicó, principalmente, mutaciones *de novo* (de Ligt et al. 2012).

También Rauch y col. (2012) compararon la secuenciación de exomas de 51 pacientes con DI no sindrómica grave esporádica y de sus padres y encontraron 16 pacientes con variantes *de novo* en genes de DI conocidos, 3 de ellos recurrentemente mutados (*STXBPI*, *SYNGAP1* y *SCN2A*), y al menos 6 con variantes de pérdida de función en 3 genes noveles adicionales. Globalmente, esto supuso un 44% de los pacientes (que podría alcanzar el 55% si se incluyen variantes de cambio de sentido con posible, pero incierta, patogenicidad) y evidenció la alta heterogeneidad de locus de la DI (Rauch et al. 2012). Una vez más, este trabajo apoya la hipótesis de una contribución de las mutaciones *de novo* al desarrollo de la DI, particularmente en sus formas esporádicas y no sindrómicas; aunque la capacidad diagnóstica debe ser tomada con precaución debido a potenciales desviaciones del estudio

(por ejemplo, la cohorte contiene más mujeres que hombres, la proporción de pacientes con epilepsia y autismo es alta y algunos pacientes tuvieron DI leve) (Gecz y Haan 2012). Este estudio también evidenció que la herencia AR parece contribuir poco a la DI en la población no consanguínea investigada (encontraron sólo una variante de cambio de sentido homocigota rara en el gen *CDK18*; sin embargo, el paciente portó otra variante *de novo* en *DAF1*, un gen previamente asociado con DI y con mayor probabilidad de ser causal. También encontraron variantes heterocigotas compuestas raras en 18 genes pero, a excepción de *ACY1*, los genes afectados no fueron previamente implicados en DI) y que la contribución de la herencia LX a la DI fue de aproximadamente un 10% de los varones participantes (además de las 2 variantes *de novo* ligadas al X en genes conocidos de DI (*IQSEC2* en un niño y *MECP2* en una niña), encontraron sólo una variante sin sentido de herencia materna en *DLG3*, también un gen de DI-LX conocido). Por otro lado, los pacientes con variantes en genes de DI conocidos no tuvieron los rasgos clínicos típicamente asociados a esos genes, indicando que existe una desviación en las descripciones de los síndromes clínicos actuales y que los trastornos tienen un rango fenotípico más amplio de lo que se pensaba (Rauch et al. 2012).

Recientemente, Gilissen y col. (2014) estudiaron el genoma completo de 50 tríos de pacientes con DI grave y sus padres no afectados y, en total, identificaron 84 SNVs e indels *de novo* en regiones codificantes (que muestran un enriquecimiento significativo de mutaciones de pérdida de función y en genes previamente implicados en DI y trastornos relacionados como autismo, esquizofrenia o epilepsia) y 8 CNVs *de novo* (incluyendo deleciones de exones únicos e intraexónicas y duplicaciones intercromosómicas y que afectaron a genes de DI conocidos más frecuentemente de lo esperado). Como hallazgo de interés, 3 de 10 SNVs *de novo* que ocurrieron en genes candidatos de DI estaban en mosaico, destacando el papel de la WGS en la detección de estos eventos. También, esta aproximación permite analizar la parte no codificante del genoma; aunque, tal y como indican los autores, el conocimiento es aún limitado como para establecer relaciones de causalidad con el fenotipo. Globalmente, encontraron que la capacidad diagnóstica de esta aproximación se situaba en un 42% de su cohorte extensamente estudiada, pues 21 de los 50 pacientes tuvieron un diagnóstico genético: 20 pacientes presentaron mutaciones (SNVs o CNVs) *de novo* en genes conocidos (n= 14) o candidato (n= 6) de DI y en 1 paciente se identificó una CNV (deleción) heterocigota compuesta en un gen conocido de DI (*VPS13B*, causante del síndrome de Cohen). No encontraron, en cambio, ni variantes LX heredadas de la madre en varones, ni SNVs homocigotas o heterocigotas compuestas en autosomas (Gilissen et al. 2014). Finalmente y en base a las tasas diagnósticas establecidas para *microarrays* genómicos (12%) y WES (27%) en pacientes de la misma gran cohorte (de Ligt et al. 2012; Vulto-van Silfhout et al. 2013), establecieron que la estima acumulativa para alcanzar un diagnóstico genético concluyente a partir de la WGS en cohortes no seleccionadas sería del 62% (60% para eventos *de novo* (39% para SNVs y 21% para CNVs) + 2% para eventos de herencia recesiva) (Gilissen et al. 2014).

El estudio *Deciphering Developmental Disorders*, un proyecto colaborativo llevado a cabo en Reino Unido y en el que se reclutaron 1.133 pacientes con trastornos del desarrollo graves (87% de ellos con DI y 10% con TEA) no diagnosticados y sus padres (Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015), consiguió una capacidad diagnóstica del 28% combinando la utilización de paneles de CGH y SNPs para la detección de CNVs y de la WES para la identificación de SNVs, *indels* y CNVs. Encontraron, además, que: (1) La mayoría de los diagnósticos fueron debidos a variantes *de novo*. (2) Las mujeres tuvieron un

campo diagnóstico debido a mutaciones autosómicas *de novo* significativamente mayor que varones. (3) Entre los diagnósticos debidos a genes únicos ($n = 148$), la mayoría de estos genes ligados a trastornos del desarrollo (64,2%; 95/148) sólo se observaron una vez, mientras que 8 (*ARID1B*, *SATB2*, *SYNGAP1*, *ANKRD11*, *SCN1A*, *DYRK1A*, *STXBP1* y *MED13L*) representaron, cada uno de ellos, el 0,5-1% de los pacientes de la cohorte. (4) En 17 de los 317 pacientes diagnosticados se identificaron 2 genes diferentes con variantes patogénicas. Este estudio, por otro lado, permitió el descubrimiento de 12 genes noveles asociados a trastornos del desarrollo, lo que implicaría un incremento de la capacidad diagnóstica de su estrategia (combinación de paneles cromosómicos y WES) hasta un 31% (Deciphering Developmental Disorders 2015).

El estudio de las formas AR de DI se ha visto dificultado por la infrecuente consanguinidad parental y el reducido tamaño de las familias en las sociedades occidentales, donde tiene lugar la mayoría de las investigaciones. Por ello, la identificación de genes causales de formas sindrómicas de DI-AR, que permite el estudio de múltiples familias con aparentemente la misma condición, ha sido más exitosa. Al contrario, la identificación de genes de formas no sindrómicas de DI-AR ha sido más lenta, aunque esto está cambiando en los últimos años gracias al desarrollo de las nuevas tecnologías (Topper et al. 2011; Iqbal y van Bokhoven 2014). La estrategia convencional para elucidar las causas genéticas de la DI-AR (no) sindrómicas ha sido el mapeo de homocigosidad en grandes familias consanguíneas, seguido del barrido de mutaciones en regiones o genes candidatos (Najmabadi et al. 2007; Kuss et al. 2011). En el año 2011, la combinación de mapeo de homocigosidad y la aplicación de nuevas tecnologías de secuenciación masiva tras enriquecimiento dirigido a los exones de los intervalos de ligamiento homocigotos en una serie de 136 familias consanguíneas con DI permitió la identificación de: (1) nuevas mutaciones en 23 genes anteriormente implicados en DI o trastornos cognitivos relacionados y (2) variantes únicas en 50 genes autosómicos nuevos que podrían considerarse candidatos en base a sus interacciones con genes causales de DI conocidos o por su implicación en procesos celulares fundamentales (como transcripción y traducción, control del ciclo celular, metabolismo energético y síntesis de ácidos grasos) que se ha visto que juegan un papel vital en la función y el desarrollo normales del cerebro (Najmabadi et al. 2011). Entre los genes asociados a DI-AR se incluyen: *PRSS12* (*protease, serine, 12* o *neurotrypsin*; OMIM 606709), *CRBN* (*cereblon*; OMIM 609262), *CC2D1A* (*coiled-coil and C2 domain containing protein 1A*; OMIM 610055), *GRIK2* (*glutamate receptor, ionotropic, kainite 2*; OMIM 138244), *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*; OMIM 601385), *TRAPPC9* (*trafficking protein particle complex subunit 9*; OMIM 611966), *MAN1B1* (*alpha 1,2 mannosidase class 1B*; OMIM 604346), *NSUN2* (*NOLI/NOP2/SUN domain family, member 2*; OMIM 610916) y *ST3GAL3* (*ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3*; OMIM 606494). La aplicación de las tecnologías de NGS en el contexto clínico está favoreciendo que el listado de genes candidato de formas de DI-AR incremente, con múltiples ejemplos en la literatura médica más reciente (Caliskan et al. 2011; Schuurs-Hoeijmakers et al. 2013; Agha et al. 2014; Thomas et al. 2014; Zhang et al. 2014; Iqbal et al. 2015; Isrie et al. 2015; Oladnabi et al. 2015).

Las SNVs causantes de formas de DI-LX han sido también extensamente estudiadas, tanto por secuenciación Sanger (Tarpey et al. 2009) como, más recientemente, por NGS en cohortes de DI. Algunos de estos trabajos son los mencionados anteriormente y en los que secuenciaron genes candidato que incluían genes del cromosoma X (Redin et al. 2014) o exomas/genomas completos (Vissers et al. 2010a; de Ligt et al. 2012; Rauch et al. 2012;

Athanasakis et al. 2014; Gilissen et al. 2014; Helsmoortel et al. 2014), mientras que otros se centraron exclusivamente en la secuenciación de genes candidato o del exoma completo del cromosoma X en cohortes de pacientes con sospecha de DI-LX (Hu et al. 2009a; Hu et al. 2009b; Hu et al. 2015; Niranjana et al. 2015). Además, los datos derivados de proyectos de WES en población general permiten evaluar la patogenicidad de las mutaciones potencialmente implicadas en DI. Así, de los 106 genes previamente asociados a DI-LX, Piton y col. (2013) confirmaron la mayoría (n= 81) pero cuestionaron la implicación clínica de 10 de ellos y destacaron otros 15 genes en los que se justificarían estudios de replicación en base a los datos de secuenciación del cromosoma X de 10.563 individuos de la población general (Piton et al. 2013). Actualmente, cada vez son más las publicaciones en la literatura médica en las que se evidencia la utilidad diagnóstica de las técnicas de secuenciación del exoma (completo o del cromosoma X) en pacientes con sospecha de DI-LX (Harakalova et al. 2012; Moncini et al. 2013; Schuurs-Hoeijmakers et al. 2013; Xu et al. 2013; Bissar-Tadmouri et al. 2014; Gandomi et al. 2014; Grotto et al. 2014; Philips et al. 2014; Shashi et al. 2014; Tran Mau-Them et al. 2014; Kolanczyk et al. 2015; Popp et al. 2015; Thevenon et al. 2015; Tonne et al. 2015).

1.2.4 Genética de los trastornos del espectro autista

Dada la naturaleza genética y fenotípicamente heterogénea de los TEA, la base de la elevada heredabilidad de estos trastornos permanece sin explicar en una proporción significativa. Hasta la fecha, los estudios de asociación del genoma completo o GWAS (de sus siglas en inglés *Genome Wide Association Studies*) realizados en pacientes con TEA no han detectado una fuerte contribución de variantes comunes a estos trastornos (Ma et al. 2009; Wang et al. 2009; Weiss et al. 2009; Anney et al. 2010; Curran et al. 2011; Anney et al. 2012). Estudios genómicos recientes, en cambio, han revelado que una parte sustancial del riesgo a padecer estos trastornos reside en variantes raras de alto impacto, incluyendo anomalías cromosómicas y CNVs (Sebat et al. 2007; Marshall et al. 2008; Glessner et al. 2009; Itsara et al. 2010; Pinto et al. 2010; Bremer et al. 2011; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Prasad et al. 2012; Girirajan et al. 2013a; Girirajan et al. 2013b; Krumm et al. 2013; Matsunami et al. 2013; Menashe et al. 2013; Poultney et al. 2013; Walker y Scherer 2013; Pinto et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015; Yuen et al. 2015), pequeñas *indels* y SNVs (Awadalla et al. 2010; O'Roak et al. 2011; Buxbaum et al. 2012; Chahrour et al. 2012; Iossifov et al. 2012; Michaelson et al. 2012; Nava et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012a; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012; Jiang et al. 2013; Lim et al. 2013; Shi et al. 2013; Toma et al. 2013; Yu et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015; Yuen et al. 2015).

1.2.4.1 Estudios de asociación del genoma completo en TEA

Hasta la fecha, los GWAS realizados en TEA para identificar variantes de riesgo comunes no han sido muy fructíferos; probablemente, esto es debido a que el riesgo relativo conferido por estas variantes es pequeño y los tamaños de las cohortes no tienen la potencia estadística suficiente para detectarlos. Por otro lado, la heterogeneidad genética y fenotípica del TEA han sido propuestas como causas adicionales de las inconsistencias de resultados entre los GWAS. Aunque se han encontrado evidencias de asociación para algunos polimorfismos individuales [por ejemplo, algunos estudios han identificado señales de asociación próximas a la significación genómica en varios genes candidatos o previamente

implicados en la susceptibilidad a padecer TEA, como es el caso de *KIAA0564*, *PLD5*, *POU6F2*, *ST8SIA2*, *TAF1C* (Anney et al. 2010) y *CNTNAP2* (Anney et al. 2012)], estas son débiles (con valores OR inferiores a 1,23) y algunas de las asociaciones alcanzadas en un estudio (total o cerca de los niveles de significación genómica) no se reproducen en otros (Ma et al. 2009; Wang et al. 2009; Weiss et al. 2009; Anney et al. 2010; Curran et al. 2011; Anney et al. 2012). Al contrario, las investigaciones en las variantes raras y mutaciones *de novo* han sido más productivas en descubrir una considerable fracción del riesgo a padecer TEA y se ha identificado variación que confiere efectos relativamente más grandes que las variantes comunes (ver subapartados 1.2.4.2, 1.2.4.3, 1.2.4.4 y 1.2.4.5 de esta Introducción).

1.2.4.2 Síndromes genéticos con TEA

Aproximadamente un 10% de los pacientes con TEA presentan una condición Mendeliana o un síndrome genético conocido asociado (Devlin y Scherer 2012). Alteraciones en estos genes son casi o completamente penetrantes para los rasgos sindrómicos pero sólo parcialmente penetrantes para TEA. Entre las condiciones más frecuentes se incluyen el síndrome del X frágil (SXF; OMIM 300624) (~1-2% de los pacientes con TEA), la esclerosis tuberosa (TSC1; OMIM 191100 y TSC2; OMIM 613254) (~1-4% u 8-14% si se presentan convulsiones), la neurofibromatosis tipo 1 (NF1; OMIM 162200) (< 1,4%) y el síndrome de Rett (RTT; OMIM 312750) (~0,5%) [revisado por (Betancur 2011; Devlin y Scherer 2012; Persico y Napolioni 2013)].

Otros defectos de genes únicos o microdeleciones causantes de síndromes conocidos (incluyendo los síndromes de Williams-Beuren (WBS; OMIM 194050), de Smith-Lemli-Opitz (SLOS; OMIM 270400), de Cohen (COH1; OMIM 216550), de Sotos (SOTOS1; OMIM 117550), de Cowden (CWS1; OMIM 158350), de Moebius (MBS; OMIM 157900) y de Timothy (TS; OMIM 601005), entre otros), algunas enfermedades mitocondriales y defectos metabólicos congénitos (como fenilcetonuria no tratada o deficiencia en adenilosuccinato liasa) se han encontrado también en autismo [revisado por (Devlin y Scherer 2012; Persico y Napolioni 2013)], aunque cada uno de estos síndromes representa < 1% de los pacientes con TEA. La incidencia de TEA en cada uno de estos síndromes es variable, pudiendo alcanzar valores próximos al 100%, como es el caso de la deficiencia en adenilosuccinato liasa [revisado por (Persico y Napolioni 2013)].

1.2.4.3 Aberraciones cromosómicas microscópicas en TEA

El cariotipado de alta resolución detecta alteraciones cromosómicas microscópicamente visibles en ~5% de los pacientes con TEA [revisado por (Betancur 2011; Devlin y Scherer 2012)], aunque diversas publicaciones han proporcionado porcentajes diferentes. Así, Xu y col. (2004) encontraron que un 7,4% de los 1.749 pacientes con TEA evaluados portaban una alteración cromosómica microscópica (Xu et al. 2004), mientras que Marshall y col. (2008) y Shen y col. (2010) detectaron estas anomalías en un 5,8% (18/313) y un 2,2% (19/852) de sus pacientes con TEA idiopático, respectivamente (Marshall et al. 2008; Shen et al. 2010).

La duplicación del alelo materno en la región 15q11q13 (OMIM 608636) que, cuando está delecionada, es causa de los síndromes de Angelman/Prader-Willi (AS/PWS), es la anomalía cromosómica citogenética más frecuentemente identificada en TEA, detectada en 1-3% de los pacientes (Baker et al. 1994). Otras alteraciones cromosómicas relacionadas con el

TEA y que han sido clásicamente detectadas por técnicas citogenéticas incluyen deleciones 2q37, 22q11.2 (DGS/VCFS) y 22q13.3 (síndrome de Phelan-McDermid) [revisado por (Betancur 2011)] y aneuploidías como el síndrome de Down (trisomía del cromosoma 21), síndrome de Turner (45,X0), síndrome de Klinefelter (47,XXY) y síndrome XYY (47,XYY) [revisado por (Devlin y Scherer 2012)].

1.2.4.4 Variantes del número de copias en TEA

La utilización de paneles de SNPs y de CGH para la detección de CNVs en la clínica y los análisis de grandes cohortes de pacientes con TEA, incluyendo tanto familias con un único miembro afecto como familias con múltiples afectados, y estudios caso-control han permitido arrojar las siguientes evidencias:

(1) Las CNVs raras *de novo* están significativamente enriquecidas en pacientes con TEA en comparación con hermanos no afectados y/o controles (Sebat et al. 2007; Marshall et al. 2008; Glessner et al. 2009; Itsara et al. 2010; Pinto et al. 2010; Bremer et al. 2011; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Prasad et al. 2012; Girirajan et al. 2013a; Girirajan et al. 2013b; Krumm et al. 2013; Matsunami et al. 2013; Menashe et al. 2013; Pinto et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015). Además, no sólo las CNVs raras *de novo* sino también las heredadas presentan grados variables de asociación a los TEA (Marshall et al. 2008; Pinto et al. 2010; Bremer et al. 2011; Levy et al. 2011; Prasad et al. 2012; Girirajan et al. 2013a; Krumm et al. 2013; Menashe et al. 2013; Pinto et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015):

El primer estudio de CNVs basado en familias con TEA data del año 2007, cuando Sebat y col. (2007) examinaron 118 familias con un único afecto, 47 familias con más de un miembro con TEA y 99 familias control e identificaron CNVs *de novo* en el 10%, 3% y 1% de estos grupos de muestras, respectivamente (Sebat et al. 2007). Posteriormente, Marshall y col. (2008) estudiaron 427 pacientes con TEA no relacionados y encontraron 277 CNVs raras en el 44% de las familias. La mayoría de estas CNVs eran heredadas mientras que 27 de ellas fueron *de novo*. Estas CNVs *de novo* se encontraron en ~7% de las familias con un único paciente en comparación con ~2% de las familias con dos o más miembros con TEA (Marshall et al. 2008). Otros posteriores documentaron un mayor porcentaje de pacientes con TEA, tanto esporádico como familiar, que portaban una CNV *de novo* en comparación con hermanos no afectados (Itsara et al. 2010; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011). Además, se presentaron evidencias de la contribución a los TEA de duplicaciones "ultrararas" heredadas y se identificaron nuevas regiones candidatas (Levy et al. 2011).

En las dos publicaciones principales que evaluaron el papel de las CNVs raras en familias con TEA de población europea del *Autism Genome Project* (AGP) (primer estudio con 996 pacientes *versus* 1.287 controles y segundo estudio, englobando al anterior, con 2.147 familias *versus* 2.640 muestras control), se confirmó un exceso de estas variantes genéticas en pacientes en relación con controles, especialmente en loci previamente implicados en TEA y/o DI. Se encontró, también, un mayor número de genes afectados por las CNVs raras (pérdidas y ganancias) en casos que en controles (Pinto et al. 2010; Pinto et al. 2014). Por otro lado, el análisis de 2.096 tríos de esta colección de muestras permitió identificar 102 CNVs raras *de novo* en 99 casos (3 de ellos con 2 eventos) y verificar que la frecuencia de estos eventos *de novo* en pacientes era también superior que en controles (4,7% frente a 1,2%,

respectivamente) (Pinto et al. 2014). No se encontraron, en cambio, diferencias significativas entre individuos de familias con un único paciente y de familias con múltiples afectos, ni en la frecuencia (5% y 4,2%, respectivamente) ni en el contenido génico ($n= 18,7$ y $18,8$, respectivamente) de las CNVs *de novo* (Pinto et al. 2010; Pinto et al. 2014). Además, se constató que la longitud media de estos eventos *de novo* en afectos (1,17 Mb) era mayor que la de las CNVs *de novo* en hermanos no afectos de la SSC (0,76 Mb) y en tríos control (0,55 Mb). Por otro lado, las CNVs *de novo* tuvieron un tamaño medio superior al tamaño medio de todas las CNVs raras en los afectos (188 kb) y controles (159 kb) y abarcaron 3,8 veces más genes en pacientes que en controles. No se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres en el tamaño (1,17 y 1,2 Mb, respectivamente) o contenido génico ($n=10$ y $17,3$, respectivamente) de las CNVs *de novo*, ni en el origen parental de las mismas (45 eventos se originaron en el alelo paterno y 40 en el materno del total de 85 de las 102 CNVs *de novo* que pudieron examinarse) (Pinto et al. 2014). Igual que Levy y col. (2011), entre las CNVs raras identificadas en estos dos estudios no sólo hubo eventos *de novo* sino también heredados (Pinto et al. 2010; Pinto et al. 2014), encontrándose que el 64% (54/84) de las CNVs patogénicas eran *de novo* (59% deleciones y 41% duplicaciones) y las restantes (36%) fueron heredadas, incluyendo 7 CNVs ligadas al cromosoma X transmitidas de una madre a sus hijos varones y 23 autosómicas. Por último, las deleciones patogénicas tendieron a ser más pequeñas que las duplicaciones y el tamaño de las CNVs *de novo* patogénicas fue, de media, significativamente más grande que el de las heredadas (3,14 Mb (excluyendo 3 individuos afectos con aneuploidías del cromosoma completo) *versus* 1,44 Mb) (Pinto et al. 2014).

Recientemente, Sanders et al. (2015) analizaron los datos de CNVs *de novo* en los 10.220 individuos de las 2.591 familias que completan la SSC, reproduciéndose la fuerte asociación de estas variantes con los TEA previamente publicada (Sebat et al. 2007; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011); en concreto, estimaron que el 4,1% de los casos de su cohorte portaban una CNV *de novo* que media el riesgo a TEA. Además de más frecuentes, las CNVs *de novo* en casos resultaron ser de mayor tamaño y más ricas en genes que las observadas en hermanos no afectos (Sanders et al. 2015). También estudiaron las CNVs heredadas raras en la SSC completa y, como previamente (Sanders et al. 2011), no encontraron un exceso significativo en casos en relación a los hermanos (tanto para CNVs totales como deleciones y duplicaciones por separado), sugiriéndose que la contribución de las CNVs heredadas raras detectadas por *microarrays* debe ser pequeña en TEA de familias con un único afecto aunque, el hecho de que algunas de estas CNVs se localizasen en loci de riesgo, les permitió concluir que un pequeño subgrupo de estas variantes confieren riesgo a TEA (Sanders et al. 2015). Por otro lado, utilizando datos de CNVs *de novo* de 4.687 casos de la SSC (Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Sanders et al. 2015) y del AGP (Pinto et al. 2014) en combinación con datos de WES de 3.982 casos de la SSC (Iossifov et al. 2014) y del *Autism Sequencing Consortium* (ASC) (De Rubeis et al. 2014), encontraron evidencias de que las deleciones pequeñas *de novo* con frecuencia contienen un único gen de TEA de alto efecto que solapa con mutaciones de pérdida de función *de novo*; en cambio, las CNVs grandes *de novo* posiblemente contienen múltiples genes de efecto moderado (Sanders et al. 2015).

(2) Múltiples CNVs raras, tanto *de novo* como heredadas, contribuyen a la susceptibilidad a los TEA y ninguna de estas variantes está presente en más del 1% de los individuos afectos, evidenciando la alta heterogeneidad de locus en la arquitectura genética de estos trastornos (Sebat et al. 2007; Marshall et al. 2008; Glessner et al. 2009; Pinto et al. 2010; Levy et al.

2011; Sanders et al. 2011; Girirajan et al. 2013a; Matsunami et al. 2013; Menashe et al. 2013; Pinto et al. 2014; Sanders et al. 2015). Varias de estas CNVs raras se han identificado recurrentemente en loci específicos que afectan a múltiples genes, incluyendo microdeleciones y/o microduplicaciones en los cromosomas 1q21.1, 3q13.2q13.31, 3q29, 7q11.23, 15q11.2q13, 16p11.2, 17p11.2, 22q11.2 y 22q13 (Ballif et al. 2007; Potocki et al. 2007; Weiss et al. 2008; Bucan et al. 2009; Depienne et al. 2009; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Girirajan et al. 2013a; Menashe et al. 2013; Shuvarikov et al. 2013; Sanders et al. 2015), mientras que otras son CNVs que implican uno o un número menor de genes, entre los que se incluyen genes altamente penetrantes que codifican proteínas de complejos sinápticos, como las neurexinas, neuroliginas y las proteínas SHANK, o proteínas de adhesión celular neuronales con importantes papeles en el neurodesarrollo y/o en la neurotransmisión (Jamain et al. 2003; Laumonnier et al. 2004; Durand et al. 2007; Glessner et al. 2009; Gai et al. 2012; Leblond et al. 2012; Bena et al. 2013; Guilmatre et al. 2014; Leblond et al. 2014). Así, recientemente, al integrar los datos de CNVs *de novo* de la SSC completa con los datos de CNVs *de novo* de los 2.096 tríos del AGP previamente publicados (Pinto et al. 2014), se pudieron confirmar 8 loci de riesgo de TEA ($FDR \leq 0,1$), incluyendo 6 CNVs multigénicas (1q21.1, 3q29, 7q11.23, 15q11.2q13, 16p11.2 y 22q11.2) y 2 monogénicas (2p16 afectando a *NRXN1* y 22q13.33 afectando a *SHANK3*), si bien se estimó la existencia de un total de 246 loci de CNVs *de novo* en TEA (181 loci para deleciones *de novo* y 168 loci para duplicaciones *de novo*) (Sanders et al. 2015).

Dentro de las aberraciones cromosómicas recurrentes que afectan a múltiples genes, en ocasiones se han podido detectar CNVs atípicas de menor tamaño que han implicado genes candidatos concretos en los fenotipos del neurodesarrollo, como es el caso de los genes *CHDIL* y *ACACA* para las deleciones 1q21 y 17q12, respectivamente (Girirajan et al. 2013a).

(3) Otro punto importante en el contexto de la genética de los TEAs, igual que se comentó anteriormente para DI, se refiere a la expresividad variable (variaciones en el fenotipo entre individuos con un genotipo determinado) y la penetrancia (probabilidad de que un individuo con un genotipo dado manifieste la clínica) incompleta. Así, la mayoría de las CNVs y variantes en genes implicados en TEA también se han encontrado en otros trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos, como DI con/sin rasgos autistas, TDAH, trastorno bipolar, y/o esquizofrenia, apuntando a un solapamiento en la etiología genética de estos trastornos. Además, hasta un 40% de las CNVs específicas de familias son heredadas de un progenitor (aparentemente) sin el fenotipo y las diferentes CNVs exhiben grados variables de penetrancia para TEA, dependiendo de múltiples factores como la sensibilidad a dosis y la función de los genes que contienen (Devlin y Scherer 2012). Como se comentó en el apartado "1.2.3.3.1 *Expresividad variable y penetrancia incompleta*", las estimas de penetrancia de las CNVs recurrentes en relación a fenotipos del neurodesarrollo y esquizofrenia han sido calculadas por diversos autores (Vassos et al. 2010; Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013). Así, aquellas CNVs con fuerte impacto en la expresión de TEA [por ejemplo, duplicación 15q11q13 materna y las CNVs causales de los síndromes de Williams-Beuren (microdelección 7q11.23; OMIM 194050), Kleefstra (microdelección 9q34.3 incluyendo al gen *EHMT1*, OMIM 610253), Smith-Magenis (microdelección 17p11.2; OMIM 182290) y Pheland-McDermid (microdelección 22q13 implicando al gen *SHANK3*; OMIM 606232)] se presentarán principalmente *de novo*, causarán síntomas de TEA más graves y serán prevalentes entre los TEA esporádicos. En cambio, aquellas CNVs con efectos más leves o moderados (por ejemplo, deleciones en 15q11.2, 16p12.1 y *SHANK2*) podrán presentarse *de novo* o heredarse de padres no afectados y podrían requerir de un "segundo evento" (o

"múltiples eventos") para manifestarse el fenotipo de TEA (Girirajan et al. 2010; Leblond et al. 2012).

(4) Como se indicó en el apartado "1.2.3.3.2 Causas de la expresividad variable y la penetrancia incompleta" de esta Introducción, Girirajan y col. (2010) propusieron el modelo de doble-evento según el cual algunas CNVs identificadas en pacientes con retraso del desarrollo por sí mismas no serían totalmente penetrantes, pero en combinación con otros factores (genéticos o no genéticos) podrían desencadenar el fenotipo (Girirajan et al. 2010). Esta hipótesis se ha propuesto también como una posible explicación de la penetrancia incompleta y/o expresividad variable manifestada por algunas CNVs recurrentes (y no recurrentes) en pacientes con TEA (Leblond et al. 2012; Kirov et al. 2013).

1.2.4.5 Variantes de un único nucleótido en TEA

En los últimos años, los avances en las técnicas de NGS y su aplicación en investigación y diagnóstico están favoreciendo también la identificación de *indels* y SNVs y, en consecuencia, de nuevos genes candidatos, causales o de susceptibilidad a los TEA (Awadalla et al. 2010; O'Roak et al. 2011; Buxbaum et al. 2012; Chahrour et al. 2012; Iossifov et al. 2012; Michaelson et al. 2012; Nava et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012a; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012; Jiang et al. 2013; Lim et al. 2013; Shi et al. 2013; Toma et al. 2013; Yu et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015; Yuen et al. 2015):

Los primeros estudios de secuenciación a gran escala, que conjuntamente analizaron los exomas de aproximadamente 1.000 familias (tríos y cuartetos) de TEA, demostraron la importancia de las *indels*/SNVs *de novo* en la etiología de estos trastornos. Además apoyaron la estima anterior, basada en la distribución de las CNVs *de novo*, de que cientos de genes (posiblemente más) estarían implicados en TEA y descubrieron, colectivamente, 9 genes con elevada probabilidad de ser de riesgo debido a que portaban eventos *de novo* altamente deletéreos (*ANK2*, *CHD8*, *CUL3*, *DYRK1A*, *GRIN2B*, *KATNAL2*, *POGZ*, *SCN2A* y *TBR1*) (O'Roak et al. 2011; Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012). Otra importante contribución de estos trabajos iniciales al conocimiento de las bases genéticas del TEA consistió en verificar que sólo una fracción de las mutaciones *de novo* de predicción de alterar la función de la proteína se esperaba que fuesen causales y que aquellas que conferían riesgo, aunque colectivamente aumentaban el riesgo de enfermedad en 5-20 veces, afectaban a genes con penetrancia incompleta (Neale et al. 2012). A pesar de la evidente extrema heterogeneidad genética del TEA, estos trabajos también apuntaron a un número relativamente pequeño de rutas biológicas implicadas (plasticidad sináptica, remodelación de la β -catenina/cromatina) (Iossifov et al. 2012; O'Roak et al. 2012b) y mostraron que proteínas codificadas por genes con mutaciones sin sentido y de cambio de sentido *de novo* presentaban un mayor grado de conectividad entre ellas y con genes previamente implicados en DI/TEA (Neale et al. 2012). En dos de estos estudios iniciales se demostró, además, que las SNVs *de novo* eran principalmente de origen paterno [relación paterno: materno de 4:1 en (O'Roak et al. 2012b)] y que se relacionaban positivamente con la edad paterna (Iossifov et al. 2012; O'Roak et al. 2012b).

Estos primeros trabajos pusieron también en evidencia que, aunque se identificaron muchas mutaciones *de novo* en TEA, pocos genes se encontraban recurrentemente afectados.

Por ello, O'Roak y col. (2012a) desarrollaron un método basado en MIP (del inglés, *Molecular Inversion Probes*) modificado que permite la resecuenciación a bajo coste en tamaños muestrales grandes y lo aplicaron capturando y secuenciando 44 genes candidatos en 2.446 pacientes con TEA. Esta estrategia les permitió encontrar 27 mutaciones *de novo* en 16 genes, 59% de las cuales fueron de predicción de truncar la proteína o de alterar el lugar de *splicing*, y estimar que mutaciones disruptivas recurrentes en 6 de estos genes (*CHD8*, *DYRK1A*, *GRIN2B*, *TBR1*, *PTEN* y *TBL1XR1*) podrían suponer el 1% de los TEA esporádicos. Otro hallazgo importante consistió en reproducir la implicación de la remodelación de la β -catenina/cromatina en la etiología de los TEA (O'Roak et al. 2012a).

Un nuevo estudio, esta vez empleando datos de WGS, investigó los patrones de mutaciones germinales en gemelos monocigóticos concordantes con TEA y sus padres. Las mutaciones *de novo* identificadas en estas muestras de gemelos afectaron a un total de 34 genes, incluyendo 29 genes codificantes de proteína y 5 ARNs no codificantes (Michaelson et al. 2012). El estudio de las mutaciones *de novo* en esos 29 genes codificantes en los datos de WES (962 casos y 560 controles) previos (Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012) permitió detectar 7 mutaciones codificantes *de novo* en 5 genes, dos de ellos (*KIRREL3* y *GPR98*) impactados dos veces en casos, y evidenciar la ausencia de este tipo de mutaciones en controles. De este modo, concluyen que existe un solapamiento significativo entre genes mutados en gemelos monocigóticos concordantes y casos de TEA esporádico en relación al número total de mutaciones, número de dobles eventos y número de genes (Michaelson et al. 2012).

La estrategia de WES ha sido también extensamente utilizada para estudiar el papel en los TEA de las mutaciones recesivas en familias consanguíneas o con ancestralidad distante compartida (Chahrour et al. 2012; Yu et al. 2013) y de la variación heredada en familias con múltiples afectos (Lim et al. 2013; Toma et al. 2013; Yu et al. 2013). Así, la secuenciación de exomas seguido del análisis de homocigosidad en 16 familias con autismo no consanguíneas, pero con evidencia de ancestralidad distante compartida, permitió identificar mutaciones recesivas potencialmente patogénicas en 4 genes candidatos noveles (*UBE3B*, *CLTCL1*, *NCKAP5L* y *ZNF18*), implicados en proteólisis, señalización mediada por GTPasas, organización del citoesqueleto y otras rutas (Chahrour et al. 2012). Por su parte, Yu y col. (2013) analizaron la variación genética en familias de TEA enriquecidas en causas heredadas debido a consanguinidad (o ancestralidad compartida entre los padres, principalmente primos) y encontraron mutaciones recesivas asociadas con TEA familiar en genes de enfermedad (*AMT*, *PEX7*, *SYNE1*, *VPS13B*, *PAH* y *POMGNT1*). El estudio de estos genes en familias no consanguíneas de la SSC (n=612 familias evaluadas, incluyendo 193 tríos y 419 cuartetos) permitió detectar un exceso modesto de mutaciones bialélicas heredadas raras (MAF < 1%) que alteraban la función de la proteína en casos comparado con controles en, al menos, uno de estos genes. Así, evidenciaron que las mutaciones bialélicas podían identificarse también en familias con TEA no consanguíneas a pesar de necesitarse análisis más extensos (en número de pacientes y de genes) para estimar su contribución y prevalencia (Yu et al. 2013). Simultáneamente, Lim y col. (2013) publicaron un estudio en el que se secuenció el exoma completo de 933 casos y 869 controles y se identificaron genes con variantes de pérdida de función (definidas estas como variantes sin sentido o de sitios de *splicing* esenciales) homocigotas y heterocigotas compuestas. Este estudio mostró una contribución al riesgo de TEA del 3% para la variación autosómica recesiva y del 2% para las variantes hemicigotas ligadas al cromosoma X raras en varones (Lim et al. 2013). La secuenciación de exoma en

familias de autismo con múltiples afectos fue la estrategia empleada por Toma y col. (2013) para estudiar el papel de las variantes raras heredadas compartidas por hermanos afectos. Para ello, secuenciaron 10 familias y verificaron 220 variantes raras transmitidas de cada padre a, al menos, dos de sus hijos afectos. Entre estas alteraciones, el 83% fueron mutaciones con cambio de sentido de predicción patogénica, el 16% fueron de predicción de causar la alteración de la proteína (mutaciones sin sentido e *indels* de cambio en la pauta de lectura) y el restante 1% estuvo representado por variantes que alteraban el lugar de *splicing* o de codón de parada (0,5% cada tipo de variante). Todas estas variantes se presentaron en heterocigosis y ningún gen estuvo mutado en más de una familia. El conjunto de variantes seleccionadas en este estudio estuvo enriquecido en genes implicados en funciones neuronales o previamente identificadas en autismo pero también en otros trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos o problemas neurológicos (epilepsia, dislexia, DI, TDAH y esquizofrenia). También encontraron una correlación negativa entre la carga de mutaciones que alteraban la proteína (sin sentido y de cambio en la pauta de lectura) y el cociente intelectual no verbal de los afectos. Finalmente, el análisis de interacción proteína-proteína con la lista de genes mutados en estas muestras reveló que el gen postsináptico *YWHAZ* es el nodo más interconectado de la red con mayor puntuación, en la que se incluyen genes previamente implicados en autismo y otros trastornos psiquiátricos (por ejemplo, *SCN1A*, *PAX3*, *KDM5C*, *TSC1*, *NF1*, *CYFIP1*, *KCNQ3* y *LAMA5*) (Toma et al. 2013).

En el año 2014, se publicaron simultáneamente dos nuevos estudios de WES en grandes cohortes de pacientes con TEA (De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014). La secuenciación de más de 2.500 familias de la SSC [incluyendo aproximadamente 800 familias previamente publicadas (Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012)] permitió evidenciar que, mientras las tasas de mutación sinónima *de novo* no diferían significativamente entre afectos (0,34 por niño) y hermanos no afectos (0,33 por niño), la mutaciones *de novo* que alteraban potencialmente el gen ocurrían a tasas significativamente mayores en pacientes (0,21) que en hermanos no afectos (0,12) y estimaron que el 43% de estas mutaciones contribuían al 9% de los casos de TEA. Identificaron, en pacientes, un total de 391 mutaciones *de novo* que alteraban potencialmente el gen en 353 genes diana (27 de ellos de forma recurrente, incluyendo los 9 identificados en los cuatro estudios iniciales de WES). El análisis de agrupamiento funcional de estos genes mostró las mayores señales de solapamiento con genes dianas de la proteína FMRP (del SXF), modificadores de la cromatina y de genes expresados en el desarrollo embrionario. Los 27 genes recurrentemente mutados mostraron también un fuerte enriquecimiento en dianas FMRP y modificadores de la cromatina (Iossifov et al. 2014). De forma similar a trabajos previos (Iossifov et al. 2012; O'Roak et al. 2012b), también encontraron que las mutaciones *de novo* eran más frecuentemente de origen paterno y que la tasa de mutación incrementaba con la edad de los progenitores lo cual, a juicio de estos autores, podría explicar parcialmente el incremento en la tasa de autismo en la descendencia de padres de edad más avanzada (Iossifov et al. 2014). Por su parte, De Rubeis y col. (2014) estudiaron el exoma de 3.871 casos de TEA y 9.937 controles del ASC; en concreto, 2.270 tríos [incluyendo los previamente publicados (Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012)], 1.601 casos y 5.397 controles de la misma población. Empleando una aproximación estadística capaz de medir la asociación con enfermedad de cada gen en base tanto a la herencia *de novo* y heredada como a la variación identificada en la muestra caso-control y considerando SNVs/*indels* de pérdida de función (mutaciones sin sentido, de cambio en la pauta de lectura y de sitio de *splicing*) y SNVs de cambio de sentido posiblemente deletéreas, identificaron 33 genes de riesgo de TEA

(incluyendo los 9 genes identificados en los estudios iniciales (Iossifov et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012) y algunos de ellos con un OR de 20 o mayor) y otros 74 genes que podrían, también, contribuir al riesgo. Conjuntamente, estos 107 genes autosómicos presentaban mutaciones de pérdida de función *de novo* en ~5% de los individuos con TEA. Finalmente, el análisis de rutas biológicas permitió implicar genes sinápticos, de regulación de la transcripción y remodelado de la cromatina en la patofisiología del TEA (De Rubeis et al. 2014).

Más recientemente, con la culminación del genotipado y la secuenciación de exoma de la SSC completa, pudo estimarse que el 6,9% de los casos de esta colección portaban una SNV *de novo* de pérdida de función que, sumados al 4,1 % de los casos debidos a CNVs *de novo* (ver subapartado anterior), sitúan en un 11 % el total de casos de TEA atribuibles a variación *de novo*; estima que, por otro lado, los autores consideran conservadora pues excluye CNVs pequeñas no detectadas por *microarrays*, variaciones estructurales y otras variantes detectadas por secuenciación diferentes a las de pérdida de función y que también podrían contribuir al riesgo (Sanders et al. 2015). Analizando conjuntamente los datos de pequeñas deleciones, *indels* y SNVs *de novo* de la SSC en combinación con datos previamente publicados del ASC (De Rubeis et al. 2014) y del AGP (Pinto et al. 2014), identificaron un total de 65 genes de riesgo ($FDR \leq 0,1$), 27 de los cuales no habían alcanzado ese umbral en las cohortes independientes. El análisis *Gene Ontology* de estos genes mostró un fuerte enriquecimiento en la regulación de la cromatina debido a 8 genes (*ARID1B*, *ASH11*, *CHD8*, *DNMT3A*, *KMT2C*, *KMT2E*, *KDM5B* y *SUV420H1*). Finalmente, vieron que estos 65 genes forman una red de interacciones proteína-proteína compuesta por dos subredes; una enriquecida en genes que codifican reguladores de la cromatina y genes de la transcripción y otra en genes de proteínas sinápticas/neuronales (Sanders et al. 2015), similar a hallazgos previos (O'Roak et al. 2012b; Iossifov et al. 2014; Pinto et al. 2014).

También recientemente y como ya se explicó en el apartado anterior para las CNVs, el estudio de 2.377 familias con autismo de la SSC permitió constatar que las SNVs heredadas privadas que generan proteínas truncadas en genes conservados están enriquecidas en casos en comparación con hermanos no afectados, que esta contribución al TEA es mayor e independiente de la aportación de las CNVs heredadas raras y que es un efecto debido a una desviación significativa de la transmisión de eventos maternos a los hijos varones (Krumm et al. 2015).

En su estudio del genoma completo de 85 familias con dos hermanos afectados, Yuen y col. (2015) no encontraron diferencias significativas en el número de mutaciones *de novo* entre hermanos (Yuen et al. 2015) y la tasa por genoma individual para este tipo de variantes fue similar a la detectada en familias con un único hijo afecto (Jiang et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014). Tanto el número de SNVs *de novo* como el de *indels de novo* se correlacionó con la edad paterna (Yuen et al. 2015) y, concordante con datos previos en familias con un único afecto (O'Roak et al. 2012b), el 76% de las mutaciones *de novo* se originaron en el cromosoma paterno. Identificaron mutaciones relevantes para TEA en 36 de las 85 familias estudiadas (lo que supone una capacidad diagnóstica del 42,4%) y encontraron que el 69,4% de los hermanos afectados portaron mutaciones relevantes diferentes, tendiendo estos a presentar más variabilidad fenotípica que aquellos que compartían la variante de riesgo (Yuen et al. 2015).

Las formas de TEA asociadas a SNVs en el cromosoma X también han sido estudiadas por tecnologías de nueva generación, bien por secuenciación de exoma/genoma completo [como algunas de las publicaciones anteriormente mencionadas (Lim et al. 2013)] o del exoma del cromosoma X en familias con sospecha de TEA-LX. Por ejemplo, Nava y col. (2012) secuenciaron el exoma del cromosoma X de 12 familias independientes con dos varones afectados y encontraron 36 variantes raras posiblemente deletéreas en 33 genes, incluyendo *PHF8* y *HUWE1* (previamente implicados en DI) y *TMLHE* (propuesto por estos autores como gen candidato en base a la detección de 2 nuevas variantes de cambio de sentido en una cohorte adicional de 501 varones con TEA no identificadas en controles) (Nava et al. 2012).

Globalmente, los estudios genómicos llevados a cabo en TEA han aportado principalmente genes no solapantes, evidenciando la elevada heterogeneidad genética de estos trastornos, en consonancia con predicciones de que deben existir ~1000 loci de TEA (Buxbaum et al. 2012) y que las variantes de riesgo identificadas hasta la fecha sólo representan una proporción de la heredabilidad global estimada. Estos estudios también han sugerido que los genes afectados por CNVs, *indels* o SNVs de pérdida de función podrían alterar rutas biológicas conectadas, existiendo evidencias de convergencia funcional hacia procesos celulares concretos, entre los que se incluyen la sinaptogénesis, la guía axonal y el desarrollo y la movilidad de las neuronas, la proliferación, la proyección y la movilidad de las células, la modificación de la cromatina, la regulación de la transcripción y el *splicing* (Glessner et al. 2009; Pinto et al. 2010; Gilman et al. 2011; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Ben-David y Shifman 2012; Chahrour et al. 2012; Griswold et al. 2012; Iossifov et al. 2012; Kou et al. 2012; Lu et al. 2012; O'Roak et al. 2012b; Saxena et al. 2012; Ebert y Greenberg 2013; Kenny et al. 2013; Matsunami et al. 2013; Noh et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Pinto et al. 2014; Sanders et al. 2015).



JUSTIFICACION Y OBJETIVOS





2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La etiología de la discapacidad intelectual (DI) y de los trastornos del espectro autista (TEA) incluye tanto factores ambientales como genéticos y, a pesar de que se estima que sus heredabilidades son elevadas, una proporción importante de los pacientes permanecen sin un diagnóstico genético definitivo. Sin embargo, gracias al desarrollo y al avance de las nuevas tecnologías, capaces de analizar el genoma completo y de hacerlo a mayor resolución que las técnicas convencionales, en los últimos años ha habido un progreso significativo en el esclarecimiento de las causas genéticas asociadas a estos trastornos. Una estrategia que está siendo particularmente útil en el descubrimiento de loci y genes asociados con estos fenotipos consiste en el genotipado de variantes del número de copias o CNVs (del inglés *Copy Number Variations*). Las CNVs (fragmentos de ADN de tamaño ≥ 1 kb y que están presentes en número de copia variable en relación a un genoma de referencia) son una fuente prevalente de variación genómica, que contribuye tanto a la variación fenotípica normal como a la susceptibilidad a padecer enfermedades en los individuos.

Este trabajo se centrará en el estudio de las bases genéticas de la DI y los TEA, concretamente en la determinación del papel de las CNVs en la etiología de estos trastornos. En el año 2010, *The International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium* recomendó la utilización de los paneles de CGH (del inglés *Comparative Genomic Hybridization*) y de los paneles de SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphisms*) como primera prueba genética en pacientes con fenotipos como DI, TEA y anomalías congénitas. Por este motivo, se realizará el genotipado de CNVs con paneles de SNPs de alta densidad del genoma completo en muestras de pacientes gallegos con DI y TEA y se perseguirán los siguientes objetivos concretos:

- 1) Estudiar el papel de las CNVs en la etiología genética de la DI y los TEA.
- 2) Determinar las contribuciones y las limitaciones de los estudios de las CNVs al conocimiento de las bases genéticas de la DI y los TEA.
- 3) Evaluar la utilidad de los paneles de SNPs como herramienta diagnóstica y determinar su campo diagnóstico en pacientes con DI y/o TEA.
- 4) Diseñar el protocolo-flujo de trabajo para el diagnóstico genético de pacientes con DI y TEA y establecer las recomendaciones para el análisis y la clasificación de las CNVs detectadas mediante técnicas moleculares.
- 5) Descripción clínica y caracterización molecular de algunos de los pacientes con CNVs exónicas raras consideradas patogénicas o potencialmente patogénicas.





RESULTADOS



3 RESULTADOS

ARTÍCULO I. Copy number variation analysis of 573 patients with intellectual disability from NW Spain.

ARTÍCULO II. Caracterización molecular y descripción fenotípica de dos casos con aberraciones cromosómicas recíprocas en la región de los síndromes de microdelección/microduplicación 3q29.

ARTÍCULO III. Clinical characterization of a male patient with the recently described 8q21.11 microdeletion syndrome.

ARTÍCULO IV. A Maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a de novo *SOX5* deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features.

ARTÍCULO V. Interstitial microdeletions including the chromosome band 4q13.2 and the *UBA6* gene as possible causes of intellectual disability and behavior disorder.

ARTÍCULO VI. Deleción en el gen *RPS6KA3* en una mujer con un fenotipo clásico del síndrome de Coffin-Lowry incluyendo episodios de caída inducidos por estímulo.

ARTÍCULO VII. Copy number variation analysis of patients with autism spectrum disorder from NW Spain.

ARTÍCULO VIII. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and comorbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2–q13.31 microdeletion.

ARTÍCULO IX. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain.

ARTÍCULO X. Phenotypic descriptions of two female patients with neurodevelopmental disorders and non-overlapping exonic deletions affecting the *AUTS2* gene: Comparison of their neurocognitive, behavioral and clinical profiles and literature review.



ARTÍCULO I. Copy number variation analysis of 573 patients with intellectual disability from NW Spain

AUTORES

Inés Quintela, Jesús Eirís, Carmen Gómez-Lado, Laura Pérez-Gay, David Dacruz, Raquel Cruz, Manuel Castro-Gago, Luz Míguez, Ángel Carracedo, Francisco Barros.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Manuscrito en preparación.

DOI

No disponible.

RESUMEN

Intellectual disability (ID) is a complex and phenotypically heterogeneous neurodevelopmental disorder characterized by significant deficits in cognitive and adaptive skills, debuting during the developmental period. In the last decade, microarray-based copy number variation (CNV) analysis has been proved as a strategy particularly useful in the discovery of loci and candidate genes associated with these phenotypes and is widely used in the clinics with a diagnostic purpose. In this study, we have evaluated the usefulness of two genome-wide high density SNP microarrays -Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array (n= 126 patients; Group 1) and CytoScan High-Density SNP array (n= 447 patients; Group 2)- in the detection of clinically relevant CNVs in a cohort of 573 ID patients from Galicia (NW Spain). In 159 (27.7 %) patients, we detected 186 rare exonic chromosomal imbalances, that were grouped into the following classes: Clinically relevant (67/186; 36.0 %), of unknown clinical significance (93/186; 50.0 %) and benign (26/186; 14.0 %). The 67 pathogenic CNVs were identified in 64 patients, which means an overall diagnostic yield of 11.2 %. Taken together, our findings confirmed that ID is also a genetically heterogeneous condition in the Galician population and demonstrated the importance of applying genome-wide high resolution SNP microarrays in the detection of its genetic etiology.



COPY NUMBER VARIATION ANALYSIS OF 573 PATIENTS WITH INTELLECTUAL DISABILITY FROM NW SPAIN

Quintela Inés¹, Eirís Jesús², Gómez-Lado Carmen², Pérez-Gay Laura³, Dacruz David², Cruz Raquel⁴, Castro-Gago Manuel², Míguez Luz⁵, Carracedo Ángel^{1,5,6}, Barros Francisco^{5,✉}

✉ Corresponding author

¹Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos - Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCI). Santiago de Compostela, Spain.

²Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Unidad de Neurología Pediátrica. Departamento de Pediatría. Santiago de Compostela, Spain.

³Hospital Universitario Lucus Augusti. Unidad de Neurología Pediátrica. Departamento de Pediatría. Lugo, Spain. ⁴Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)-Instituto de Salud Carlos III. Santiago de Compostela, Spain. ⁵Grupo de Medicina Xenómica, CIBERER, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica - SERGAS. Santiago de Compostela, Spain. ⁶King Abdulaziz University, Center of Excellence in Genomic Medicine Research. Jeddah, Saudi Arabia.

CORRESPONDING AUTHOR CONTACT INFORMATION

Francisco Barros, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica.

Edif. Consultas Externas planta -2. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. 15707 Santiago de Compostela, Spain.

KEY WORDS

Intellectual disability, global developmental delay, autism spectrum disorder, SNP microarray, chromosome microarray analysis, copy number variation, incomplete penetrance, variable expressivity, multiple-hit model, diagnostic yield.

RUNNING HEADS

Authors: Quintela et al.

Shorter version of the title: CNV analysis of ID patients from NW Spain.

ABSTRACT

Intellectual disability (ID) is a complex and phenotypically heterogeneous neurodevelopmental disorder characterized by significant deficits in cognitive and adaptive skills, debuting during the developmental period. In the last decade, microarray-based copy number variation (CNV) analysis has been proved as a strategy

particularly useful in the discovery of loci and candidate genes associated with these phenotypes and is widely used in the clinics with a diagnostic purpose. In this study, we have evaluated the usefulness of two genome-wide high density SNP microarrays - Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array (n= 126 patients; Group 1) and CytoScan High-Density SNP array (n= 447 patients; Group 2)- in the detection of clinically relevant CNVs in a cohort of 573 ID patients from Galicia (NW Spain). In 159 (27.7 %) patients, we detected 186 rare exonic chromosomal imbalances, that were grouped into the following classes: Clinically relevant (67/186; 36.0 %), of unknown clinical significance (93/186; 50.0 %) and benign (26/186; 14.0 %). The 67 pathogenic CNVs were identified in 64 patients, which means an overall diagnostic yield of 11.2 %. Taken together, our findings confirmed that ID is also a genetically heterogeneous condition in the Galician population and demonstrated the importance of applying genome-wide high resolution SNP microarrays in the detection of its genetic etiology.

ABBREVIATIONS

DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition; ID: Intellectual Disability; GDD: Global Developmental Delay; ISCA: International Standards for Cytogenomic Arrays; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; CGH: Comparative Genomic Hybridization; ASD: Autism Spectrum Disorder; MCA: Multiple Congenital Anomalies; CNV: Copy Number Variants; NGS: Next Generation Sequencing; SNV: Single Nucleotide Variant; ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; FISH: Fluorescence In Vitro Hybridization; MRI: Magnetic Resonance Imaging; PCR: Polymerase Chain Reaction; AGCC: Affymetrix GeneChip Command Console; ChAS: Chromosome Analysis Suite; QC: Quality Control; MAPD: Median Absolute Pairwise Difference; IBD: Identical-By-Descent; PCA: Principal Component Analysis; DGV: Database of Genomic Variants; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; ISCA: International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium; DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; NAHR: Nonallelic Homologous Recombination.

INTRODUCTION

In the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5), intellectual disability (ID) is defined as a complex and clinically heterogeneous neurodevelopmental disorder characterized by a significant deficit in cognitive and adaptive skills, with onset during the developmental period. Intellectual disabilities also include global developmental delay (GDD) -used for patients under the age of 5 years whose intellectual functioning cannot be accurately assessed but a significant delay in several areas of development is detected- and unspecified ID -used for patients over the age of 5 years when the clinical severity level cannot be assessed because of sensory or physical impairments (APA 2013). In Western countries, the prevalence of GDD/ID is estimated to be between 1-3 % in the general population and approximately 0.3-0.6 % is severely affected (Leonard and Wen 2002; Patel et al. 2010; APA 2013).

The genetic basis of ID is still unclear in most of the affected children (Ropers 2008; Kaufman et al. 2010; Ropers 2010), with the extensive genetic heterogeneity as one of the plausible explanations. In 2010, The International Standards for Cytogenomic Arrays (ISCA) Consortium recommended the use of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and Comparative Genomic Hybridization (CGH) arrays as a first-tier diagnostic test in patients with phenotypes such as GDD/ID, autism spectrum disorders (ASDs) and multiple congenital anomalies (MCA) (Miller et al. 2010), allowing the identification of rare microdeletions and microduplications (numerical submicroscopic chromosome abnormalities, collectively known as copy number variants or CNVs) as new genetic causes associated with these neurodevelopmental disorders (Cooper et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Kaminsky et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Vulto-van Silfhout et al. 2013; Coe et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Wright et al. 2015). Also recently, next-generation sequencing (NGS) technologies have been proven successful for the detection of single nucleotide variants (SNVs), small insertion-deletions (*indels*) and CNVs implicated in ID (Hu et al. 2009a; Hu et al. 2009b; Vissers et al. 2010; Najmabadi et al. 2011; de Ligt et al. 2012; Rauch et al. 2012; de Ligt et al. 2013; Piton et al. 2013; Athanasakis et al. 2014; Coe et al. 2014; Gilissen et al. 2014; Helsmoortel et al. 2014; Redin et al. 2014; Vergult et al. 2014; Deciphering Developmental Disorders 2015; Hu et al. 2015; Niranjana et al. 2015; Wright et al. 2015). Many of the CNVs and genes involved in neurodevelopmental phenotypes are characterized by variable expressivity and incomplete penetrance (Malhotra and Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013), making their clinical interpretation a challenging task (Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013).

Here, we evaluate the utility of two Affymetrix genome-wide SNP microarrays - Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array and CytoScan High-Density SNP array- to

detect clinically relevant CNVs in DNA samples from 625 patients with ID from Galicia (NW Spain).

MATERIALS AND METHODS

1. Patients and clinical assessment

A total of 625 Galician (NW Spain) patients were recruited from the Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela and referred to the Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica for genetic study by means of genome-wide SNP arrays. All participants had a clinical diagnosis of unexplained GDD or ID with or without another medical condition (e.g. ASD, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), epilepsy, dysmorphic features and/or congenital anomalies). The age at assessment ranged from 3 months to 18 years and the male-to-female gender ratio was 1.5 (375 males and 250 females). The GDD/ID, ASD and ADHD diagnoses were based on the DSM-5 and the exclusion criteria were: (1) Patients with a non-genetic etiological diagnosis, (2) patients with a clinically recognizable syndrome, (3) patients positive for conventional cytogenetics (karyotyping and/or FISH) and/or Fragile X syndrome or (4) patients for whom, based on their clinical characteristics, sequencing (specific gene, gene panels, X-chromosome or whole genome/exome sequencing) was indicated as a better experimental approach.

Clinical data was provided by the referring physician and included a medical history (i.e. anamnesis, personal and family histories, physical and dysmorphological examination) and basic complementary tests, including haemogram test, conventional biochemical profile, thyroid hormone profile (FT3, FT4 and TSH), brain magnetic resonance imaging (MRI), abdominal ultrasound, bone scan, cardiac examination, hearing test and ophthalmological examination.

The parents or legal representatives gave their written informed consent and the study was approved by the local ethical committee (Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo; 2015/189).

2. Microarray-based copy number variation analysis and quality control

Genomic DNA was obtained from peripheral blood and isolated using Chemagic DNA Blood100 kit, following the manufacturer's recommendations (Chemagic DNA Blood100 kit protocol) (PerkinElmer Chemagen Technologies GmbH, Germany).

DNA samples were then genotyped using the Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array (n= 143 patients; Group 1) and the CytoScan High-Density SNP array (n= 482 patients; Group 2), following strictly the manufacturer's instructions (Affymetrix Cytogenetics 2.7M™ Assay Protocol and Affymetrix CytoScan™ Assay User Manual, respectively) (Affymetrix, Santa Clara, CA, US). Both arrays have a genome-wide

design with a coverage of approximately 2.7 million markers for the detection of chromosomal aberrations at a gene level and include 400,103 and 743,304 SNPs. Briefly, the Cytogenetics 2.7M assay started with a whole genome amplification of 100 ng of total genomic DNA, followed by a purification step with para-magnetic beads. After that, the purified samples are fragmented, biotin-labeled and hybridized to a Cytogenetics Array. For samples genotyped using the CytoScan High-Density SNP array, a total of 250 ng of genomic DNA was first digested with the *Nsp* I restriction enzyme to generate fragments of 200 to 1,100 base pairs (bp). These fragments were then ligated to a *Nsp* I adaptor, amplified through PCR, purified using para-magnetic beads and fragmented to less than 200 bp using the DNase I enzyme. Fragmented DNA was end-labeled and hybridized to the CytoScan High-Density SNP cartridge. In both protocols, the samples were finally washed, stained and scanned, steps controlled by the GeneChip Command Console (AGCC) software, version 4.1.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), and image files were automatically processed for allele calling and quality control assessment.

Microarray-based copy number variation analysis was performed using the Chromosome Analysis Suite software (ChAS), version 1.2.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and genomic imbalances were annotated based on the GRCh37/hg19 Genome Build (Feb 2009). The main quality control (QC) parameters were the Median Absolute Pairwise Difference (MAPD) and SNP-QC scores for copy number and SNP probes, respectively. Samples with MAPD >0.27 and SNP-QC <1.1 for the Cytogenetics array or MAPD >0.25 and SNP-QC <15 for the CytoScan HD array were excluded from the analysis. Those samples genotyped with the CytoScan HD array were also checked for duplicates and relatives with an IBD (Identical-By-Descent) analysis using Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (Purcell et al. 2007). Those pairs showing an IBD value >0.185 were evaluated (Anderson et al. 2010) and only one individual from each pair was retained. In addition, outliers were identified by Principal Component Analysis (PCA) and individuals whose PC loadings were more than six standard deviations away from the mean of PC1 or PC2 were discarded (Price et al. 2006). Finally, samples that passed QC metrics but showed chromosomal abnormalities longer than > 7.5 Mb or long runs of homozygosity and patients with phenotypically recognizable syndromes were excluded from the main analyses and listed as Supplemental Data. A cutoff of >7.5 Mb was selected to be consistent with large cytogenetically visible chromosome abnormalities, as recommended by (Pinto et al. 2014).

For patients with abnormal microarray findings, parental testing was undertaken, when possible, in order to determine the inheritance pattern of the deletion and/or duplication. For this purpose, chromosomal microarray analysis (using Affymetrix Cytogenetics 2.7M, CytoScan HD or CytoScan 750K SNP arrays, following the manufacture's specifications) and/or standard karyotyping or FISH (in cases where a

parental balanced translocation/inversion was a potential underlying explanation for the patient's genotype) were performed.

After sample filtering, all CNVs went through further QC filtering. Firstly, raw CNVs in the same sample were joined together if the distance between them was less than 50 % of their combined length. CNVs were then excluded if: (1) they were covered by a mean marker distance (calculated dividing the size of the CNV by the number of markers in the segment) greater than 2.5 kb, (2) were detected with less than 100 markers (for Cytogenetics array) or 140 and 60 markers for copy number gains and losses, respectively (for CytoScan HD array) (these values were obtained from the 90th percentile of the distribution of gains and losses, observed in a preliminary analysis of this study after excluding those CNVs with a mean marker distance higher than 2.5 kb), (3) were less than 100 kb in length, or (4) were chromosome Y-CNVs. These "clinical settings" exceeded the standard thresholds recommended by Affymetrix and were also more stringent than those previously established in the literature after validation analysis (D'Amours et al. 2014; Choucair et al. 2015; Uddin et al. 2015). Finally, the remaining high quality CNVs were merged together and non-exonic CNVs were filtered out using an in-house developed program (ExonReducer3).

3. CNV classification criteria

In order to classify and assess the clinical relevance for a particular CNV, we first identified exonic CNVs previously associated with neurodevelopmental or neuropsychiatric phenotypes from the list of CNVs analyzed by Kirov et al. [2013]. As they previously defined, a CNV was called as covering a CNV locus if it spanned >50 % of the region commonly accepted for that variant. In the case of loci that include only single genes, we accepted CNVs that intersected at least one exon of the gene in question (Kirov et al. 2013). Second, we used an in-house developed program to filter out polymorphic CNVs; i. e., CNV loci with a frequency >1 % in our patients and > 1 % in 894 controls (253 genotyped with the Cytogenetics 2.7M array + 641 genotyped with the CytoScan HD array) of European ancestry (provided by Affymetrix), as well as those exonic CNVs present in the Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) as common variation were excluded for further analyses. For that purpose, CNVs with >50 % overlapping were considered the same aberration. These two sets of CNVs ("Kirov CNVs" and CNVs at frequency <1%) were merged together for classification and later referred to as "rare exonic CNVs".

In order to classify these rare exonic CNVs, we considered their type (gain and loss), size, location, gene content and inheritance pattern (when DNA samples from the patient's parents were available), as well as the patient's phenotypes and their clinical data. By searching genome variant databases, including Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), ClinGen Dosage Sensitivity Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>), ISCA database

(<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>), Clinical Genomic Database (<http://research.nhgri.nih.gov/CGD/search/>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) and published literature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), CNVs were finally classified as (1) **Clinically relevant**, if they were previously reported as a risk factor or causal for ID or any other neurodevelopmental or psychiatric disorder or if a clinical impact on the phenotype could be definitively established, based on their type (gain or loss), size (those aberrations larger than 3 Mb were all considered as clinically significant (Kearney et al. 2011)), location, gene content and/or inheritance pattern; (2) **of unknown clinical significance** if, at the time of reporting, it was not possible to unambiguously determine their effect on the phenotype and (3) **benign**, if they only covered non-coding RNAs, were gene-poor (maximum of 2 genes) with no evidence of association with the phenotype for any of the genes within the aberration and/or were well-documented as a benign variant in multiple peer-reviewed publications and/or curated databases. CNVs reported as of uncertain clinical significance were subclassified as: (A) *likely pathogenic* if: (1) there was evidence in the literature of patients with similar genotype and phenotype, but this was not conclusive to be considered definitely pathogenic; (2) there were multiple examples of equivalent CNVs mostly considered probably causal in patient repositories (e. g., ISCA or DECIPHER); (3) they were deletions encompassing candidate genes for autosomal dominant forms of ID/ASD and/or (4) they partially overlapped with a known genomic syndrome and included relevant gene/s for the phenotype; (B) *non subclassified*, a broad category including those rare exonic CNVs that did not meet the criteria to be classified as (likely) pathogenic or (likely) benign; for example, unknown CNVs found in more than one patient in our internal database or if there was insufficient, contradictory or inconclusive information in the literature or curated databases and (C) *likely benign*, when there was no evidence of association with the phenotype for any of the genes within the aberration, but the number of genes exceeded the maximum established for benign variants.

RESULTS

1. Sample distribution and quality control

From our initial cohort of 625 participants (375 males and 250 females; gender male-to-female ratio of 1.5), a total of 24 samples were excluded after quality control filtering based on MAPD and SNP-QC scores. Thirteen siblings and 15 patients with chromosomal abnormalities longer than 7.5 Mb, long runs of homozygosity or clinically recognizable syndromes (Table S1 of Supplemental Data) were also discarded, resulting in a final series of 573 individuals (126 patients from Group 1 and 447 patients from Group 2). The number of patients and the distribution by array platform and gender are shown in Table I.

2. Microarray-based copy number variation analysis

In our final cohort of 573 individuals, we identified 186 rare exonic CNVs in 159 patients (27.7 %). The number and percentage of patients with CNVs and the distribution by array platform and gender are shown in Table II. These 186 CNVs (110 copy number gains and 76 copy number losses) contained a median of 4 genes (average of 14) and ranged in size from 101,502 to 7,384,142 bp with a median size of 511,654 bp (average of 1,172,824 bp). The CNV distribution by type, array platform and gender is also shown in Table II. We detected 26 patients (4.5 % of the cohort) with more than one rare exonic CNV (Table II).

3. CNV classification and clinical interpretation

After comparing with genomic variants present in public curated databases and reviewing the literature and following the classification criteria described in the "Material and Methods" section, the 186 rare exonic CNVs detected in our patients were grouped into three classes: (1) **Clinically relevant** (67/186; 36.0 %), (2) **of unknown clinical significance** (93/186; 50.0 %) and (3) **benign** (26/186; 14.0 %) (Tables III, IV and V, respectively) (Figure I).

Clinically relevant CNVs: In this first group, we included 67 chromosomal aberrations (34 gains and 33 losses) that were assigned to the following categories: CNVs totally overlapping with *known genomic disorders* (Category A; 44/186 (23.7 %) CNVs; 23 gains and 21 losses); *telomeric rearrangements* (Category B; 6/186 (3.2 %) CNVs; 5 gains and 1 loss); *different-sized, pathogenic CNVs* (Category C; 13/186 (7.0 %) CNVs; 5 gains and 8 losses); and *monogenic CNVs disrupting a gene known to be associated with neurodevelopmental disorders* (mainly, GDD/ID and ASD genes) (Category D; 4/186 (2.2 %) CNVs; 1 gain and 3 losses) (Table III; Figure I). These 67 causal copy number events were found in 64/573 (11.2 %) patients (thirteen of whom carried additional rare exonic CNVs in their genomes), included from 1 to 146 genes (median of 27; mean of 32) and their lengths ranged from 561 to 7,384,142 bp (median of 1,625,432 bp; mean of 2,328,042 bp) .

CNVs of unknown clinical significance: The second group included 93 CNVs (66 gains and 27 losses) of uncertain clinical significance, that were subclassified as: *likely pathogenic* (Category A; 15/186 (8.1 %) CNVs; 11 gains and 4 losses), *non subclassified* (Category B; 69/186 (37.1 %) CNVs; 49 gains and 20 losses) and *likely benign* (Category C; 9/186 (4.8 %) CNVs; 6 gains and 3 losses) (Table IV; Figure I). These chromosome aberrations were found in 82/573 (14.3 %) patients (twelve of whom carried 2 variants of uncertain significance, while eight combined the uncertain CNV with a pathogenic (n = 6), a pathogenic and a benign (n= 1) or a benign (n = 1) event), encompassed from 1 to 35 genes (median of 2; mean of 5) and ranged in size from 102,117 to 2,830,002 bp (median of 411,582 bp; mean of 569,139 bp).

Benign CNVs: Finally, a total of 26/186 (14 %) CNVs (14 gains and 12 losses) were considered benign for DD/ID (Table V; Figure I). They were detected in 26/573 (4.5 %) patients and their sizes were in the range of 101,502 to 1,089,366 bp (median of 295,566 bp; mean of 333,687 bp).

4. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis

The 67 clinically relevant CNVs were detected in 64 patients (8 from Group 1 and 56 from Group 2), which means that 11.2 % of our total sample (6.3 % of Group 1 and 12.5 % of Group 2) could have a genetic diagnosis. This diagnostic yield might increase up to 13.6 % of our patients (7.1 % and 15.4 % of Groups 1 and 2, respectively) if CNVs classified as likely pathogenic could be finally considered causative.

DISCUSSION

1. Sample distribution and quality control

In general, cognitive defects are significantly more common in males than in females (average male-to-female ratio of 1.6) (APA 2000; APA 2013). In line with this value and similar to recent previous reports on series of patients with unexplained neurodevelopmental disorders (Battaglia et al. 2013; Shoukier et al. 2013; Roberts et al. 2014; Choucair et al. 2015), the male-to-female ratio in our sample of 625 Galician patients was 1.5 (Table I).

From our initial cohort, 96.2 % of samples were successfully genotyped and no significant differences between platforms were detected (Table I; $P = 0.4598$, Fisher's exact test), an expected result since, although different methodologies, these technologies have the same DNA quality requirements, all samples were processed in the same laboratory and an standardized DNA extraction protocol was used in both sample groups.

2. Microarray-based copy number variation analysis

We found 186 rare exonic CNVs (110 gains and 76 losses) in 27.7 % of our patients (21.4 % of Group 1 and 29.5 % of Group 2) (Table II), which is in keeping with literature data (Wincent et al. 2011; Bartnik et al. 2013; Battaglia et al. 2013; Rodriguez-Revenga et al. 2013; Shoukier et al. 2013; Bartnik et al. 2014; Kashevarova et al. 2014; Roberts et al. 2014). Importantly, twenty-six (4.5 %) patients carried more than one CNV (Table II), in line with the "two-hit hypothesis", previously proposed for neurodevelopmental disorders (Girirajan et al. 2010).

Different to previous studies (Menten et al. 2006; Battaglia et al. 2013; Roberts et al. 2014), we observed a higher percentage of rare exonic copy number gains than losses (Table II). The sample selection criteria and technical factors, such as differences in

array resolution and CNV detection algorithms between genotyping systems, quality control parameters for CNV definition (e. g., minimum number of consecutive probes and maximum intermarker distance) and/or CNV inclusion criteria (e. g., frequency, size range, inheritance pattern and/or autosomal-CNVs only *vs.* autosomal plus X- and/or Y-CNVs), might contribute to discrepancies across publications.

3. CNV classification and clinical interpretation

Clinically relevant CNVs (Figure I; Table III):

Following the classification criteria described in the "Material and Methods" section, we could definitively infer the clinical significance of 36 % of the CNVs detected in our cohort (Figure I; Table III).

Known genomic disorders (Figure I; Table III, Category A; 44/186 (23.7 %) CNVs): Forty-four out of our final 573 (7.7%) patients fitted into this category. Literature review shows that the overall diagnostic yield for known microdeletion/microduplication syndromes varies across publications. Previously, in two cohorts of patients with DD/ID (n=1,170), the diagnostic yield due to microdeletion syndromes was reported to be 5.3 % (Rauch et al. 2006), while 14.5 % of the 200 Spanish patients with DD/ID evaluated by (Rodríguez-Revena et al. 2013) or 8.8 % of the 79 Russian patients with ID studied by (Kashevarova et al. 2014) presented known microdeletion/microduplication rearrangements. Shoukier et al. [2013] found that 12 % of 342 patients with unexplained DD/ID had an imbalance that fitted into this category, with a higher proportion of deletions than duplications (Shoukier et al. 2013), while 4 % of the 1,000 individuals (including those with clinically recognizable syndromes and/or rearrangements longer than 7.5 Mb) with ID, MCA and/or ASD in a recently reported study could have a genetic diagnosis due to a known recurrent genomic disorder, also with more deletions compared to duplications (Carreira et al. 2015). Similar to previous publications (Ahn et al. 2013; Carreira et al. 2015), chromosomal imbalances involving 16p11.2 and 22q11.2 loci were the most common findings in our ID cohort, with 10 and 6 CNVs, respectively.

These recurrent disorders are frequently due to local genomic instability generated by the presence of low-copy repeats or segmental duplications which predispose to chromosome or chromatid misalignment followed by nonallelic homologous recombination (NAHR). They have been found in patients with a wide variety of phenotypes, including GDD/ID, ASD, schizophrenia, bipolar disorder and epilepsy and, in general, are also characterized by incomplete penetrance (Malhotra and Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013). In consequence, the clinical interpretation is not always straightforward (Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013), making family genetic counseling a challenge. This is especially delicate when these genomic rearrangements are inherited from a healthy parent, as is the case in 10 out of our patients with known microdeletion and microduplication syndromes in whom

parental test could be done (1 paternally inherited and 9 maternally inherited) (see Table III, Category A), and when clinical evaluation of the carrier progenitor is incomplete or unavailable. The search for additional genetic factors, as potential modifiers of the phenotype, is then justified. In our study, eight patients within this category carried at least one additional rare exonic CNV in their genomes (see Table III, Category A), suggesting that the multiple-hit model (Girirajan et al. 2010) might be the underlying mechanism to explain their phenotypes. Nevertheless, the concomitant presence of additional genetic variants not detected by microarrays, as SNVs or *indels*, as well as the existence of epigenetic and/or environmental factors cannot be ruled out in these patients.

Detailed clinical descriptions and molecular findings for five out of the patients belonging to this category have been recently published by our group: Patient ID_567 (arr[hg19] 2q22.3q23.3(148,173,639-151,159,692)x1 dn) (Perez-Gay et al. 2013), Patients ID_109 (arr[hg19] 3q29(195,690,227-197,356,334)x1 not maternal) and ID_245 (arr[hg19] 3q29(195,718,745-197,344,176)x3) [(Quintela et al. 2015b); [ARTÍCULO II](#)], Patient ID_474 (arr[hg19] 8q21.11q21.13(74834763-81904679)x1 not maternal) [(Quintela et al. 2015c); [ARTÍCULO III](#)] and Patient ID_6 (arr[hg19] 12p12.1(23,769,086-24,262,524)x1 dn,16p13.11p12.3(15,286,149-18,771,863)x3 mat) [(Quintela et al. 2015e); [ARTÍCULO IV](#)].

Telomeric rearrangements (Figure I; Table III, Category B; 6/186 (3.2 %) CNVs): Five out of our 573 (0.9 %) patients carried terminal telomeric rearrangements, a type of chromosomal aberrations with important consequences in neurodevelopment due to the fact that, compared to other locations in the genome, telomeres are relatively rich in genes (Saccone et al. 1992). Patient ID_127 (arr[hg19] 1p36.33(849,466-2,098,337)x1 not maternal, 4q32.1(156,759,265-157,037,360)x1 maternal) is a 13-year-old girl female with ID, ADHD, hyperphagia, facial dysmorphic features, arachnodactyly, scoliosis, myopia and astigmatism who presented a not maternally inherited 1pter deletion, included within the chromosome 1p36 deletion syndrome region (OMIM 607872). Patient ID_335 (arr[hg19] 6q27(169,367,047-170,919,482)x1), a 12-year-old boy with a diagnosis of ID, obsessive and compulsive behaviors and facial dysmorphic features, had a 1.5 Mb loss at 6qter including the four critical genes (*THBS2*, *PHF10*, *DLL1*, and *C6orf70*) previously proposed for brain malformation in patients with terminal deletions of 6q27 (Peddibhotla et al. 2015). There are several examples of patients, both in the literature (Chen et al. 2012; Zhou et al. 2014; Peddibhotla et al. 2015) and in databases as ISCA or DECIPHER, with chromosomal aberrations partially overlapping with that presented in our patient, supporting its clinical significance. In Patient ID_471 (arr[hg19] 8p23.3p23.1(172,851-7,556,993)x1,9q32q34.3(117,033,510-141,051,515), a 14-year-old female with severe ID, disruptive behaviors and ASD, microarray analysis found a 8pter deletion involving 46 genes, including the *MCPH1* gene (MIM 607117; autosomal recessive microcephaly and ID) implicated in ID (Pinto et al. 2014) and a 24 Mb copy

number gain on 9qter, missed in our list of chromosomal abnormalities for being detected with a median intermarker distance higher than 2.5 kb (but confirmed by karyotype as an unbalanced product of a paternal translocation). This second event was in a rich-gene region, encompassing 340 genes, amongst of which *EHMT1* (MIM 607001; Kleefstra syndrome (9q subtelomeric deletion syndrome)), *INPP5E* (MIM 613037; Joubert syndrome 1), *KCNT1* (MIM 608167; malignant migrating partial seizures of infancy; nocturnal frontal lobe epilepsy, ID) and *MAN1B1* (MIM 604346; autosomal recessive non-syndromic ID) are considered ID-associated genes (Pinto et al. 2014). In Patient ID_27 (arr[hg19] 9q34.2q34.3(136,222,628-141,020,389)x3,17p13.3(525-238,565)x1), a 15-year-old male with ID and ADHD, the 17pter deletion only encompassed 2 genes while the 9qter duplication involved 121 genes, including the same four ID-genes mentioned for Patient ID_471 (*EHMT1*, *INPP5E*, *KCNT1* and *MAN1B1*) (Pinto et al. 2014). Finally, microarray analysis of Patient ID_350 (arr[hg19] 22q13.31q13.33(48,160,896-51,183,870)x1), a 12-year-old male who presented ID and disruptive behaviors, revealed a 22qter deletion, including the minimal critical region (*SHANK3*; OMIM 606230) for the Phelan-McDermid syndrome (OMIM 606232).

Different-sized pathogenic CNVs (Figure I; Table IV, Category C; 13/186 (7.0 %) CNVs), both copy number gains (n=5) and losses (n=8), were detected in 13 out of our 573 (2.3 %) patients. These CNVs sized from 306 kb to 7.2 Mb and encompassed from 5 to 93 genes. As illustrative examples of this category, we recently reported on two of these patients, who presented overlapping deletions at chromosome 4q13: A maternally inherited 3.84 Mb copy number loss at 4q13.1-q13.2 identified in a family with mild ID and ADHD (Patient ID_191's family; arr[hg19] 4q13.1q13.2(65,736,024-69,582,428)x1 mat) and a *de novo* 6.81 Mb deletion at 4q13.2-q13.3 in a female patient with mild ID, behavior disorder, short stature and minor facial dysmorphism (Patient ID_533; arr[hg19] 4q13.2q13.3(68,207,272-75,021,494)x1 dn,11q24.2(126,463,132-126,677,128)x3 mat) [(Quintela et al. 2015d); [ARTÍCULO V](#)].

Monogenic exonic CNVs disrupting an ID and/or ASD gene (Figure I; Table III, Category D; 4/186 (2.2 %) CNVs) were identified in 4 (0.7 %) patients. Detailed clinical descriptions were provided for two of them in recent clinical reports published by our group: Patient ID_6 (arr[hg19] 12p12.1(23,769,086-24,262,524)x1 dn,16p13.11p12.3(15,286,149-18,771,863)x3 mat) with a *SOX5* (OMIM 604975) deletion [(Quintela et al. 2015e); [ARTÍCULO IV](#)] and Patient ID_166 (arr[hg19] Xp22.12(20,173,856-20,360,913)x1 not maternal) with an X-CNV affecting *RPS6KA3* (OMIM 300075) [(Quintela et al. 2015a); [ARTÍCULO VI](#)]. Additionally, we described the clinical features and molecular findings of Patient ID_45 (arr[hg19] 12p13.33(2,366,516-2,571,012)x1), who carried a *CACNA1C* (OMIM 114205) copy number loss, and Patient ID_401 (arr[hg19] Xq25(122,312,033-122,593,583)x2), with a monogenic gain at chromosome Xq25, disrupting the *GRIA3* (OMIM 305915) gene (see Supplemental Data of this manuscript).

CNVs of unknown clinical significance (Figure I; Table IV) and **benign CNVs** (Figure I; Table V):

Following the classification criteria detailed in the "Material and Methods" section, we could not definitively infer the clinical impact of 50 % of the CNVs detected in our cohort, while the remaining 14 % of aberrations were considered benign (Figure I; Tables IV and V). Most of the uncertain chromosomal aberrations are very rare events and, as suggested for previous findings (Palmer et al. 2013), our classification may eventually change as more patients are submitted to databases and more knowledge and sufficient evidences are available in the literature. We have selected five patients with chromosomal imbalances of yet unclear clinical significance for further discussion (see Supplemental Data of this manuscript).

4. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis

The diagnostic value of microarray-based copy number analysis depends on multiple factors, including the resolution and probe distribution of the genotyping platform, the patient selection criteria, if previous assays were performed and the CNV classification algorithm (Hehir-Kwa et al. 2007; Koolen et al. 2009; Hehir-Kwa et al. 2010; Miller et al. 2010; Hochstenbach et al. 2011; Hehir-Kwa et al. 2013; Rodriguez-Reventa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013). In the present study, the 67 CNVs classified as pathogenic were detected in 64 patients, which means that our overall diagnostic yield was 11.2 % (Table VI), in keeping with the 10-20 % estimated in the literature for patients with DD/ID in larger cohorts (Buysse et al. 2009; Hochstenbach et al. 2009; Koolen et al. 2009; Sagoo et al. 2009; Miller et al. 2010; Xiang et al. 2010; Cooper et al. 2011; Hochstenbach et al. 2011; Kaminsky et al. 2011) and in recent publications on similar-sized cohorts of ID patients, also evaluated with genome-wide high resolution microarrays (Wincent et al. 2011; Bartnik et al. 2013; Rodriguez-Reventa et al. 2013; Shoukier et al. 2013; Bartnik et al. 2014; Kashevarova et al. 2014; Roberts et al. 2014; Choucair et al. 2015). Nevertheless, our results should be interpreted with caution and considered as provisional: First, we have applied very stringent QC thresholds and only high-confidence CNVs were included for classification. In consequence, we suggest that the diagnostic utility of chromosomal microarray analysis would be higher if experimental validation were performed on those rare exonic CNVs detected under less stringent thresholds. Second, two patients with benign variants carried heterozygous deletions involving genes associated to autosomal recessive forms of ID (Table V), so a conclusive genetic diagnosis might be established if additional genetic variants on the non-deleted allele were detected. Third, as the aim of our study was genetic diagnosis, only exonic CNVs were considered for classification and clinical interpretation. However, not only exonic but also intronic and/or intergenic chromosomal aberrations involving, for example, regulatory elements, can be disease-associated variants (Spielmann and Klopocki 2013; Turner et al. 2016). And finally, our diagnostic yield might potentially increase up to 13.6 % if CNVs classified as likely pathogenic could be finally

considered as causative. In that sense, Palmer et al. [2013] found evidences of how the interpretation of chromosomal microarray analysis can change over time, with an increase in putatively pathogenic CNVs, as long as new literature and interpretative resources emerge (Palmer et al. 2013).

The two microarrays used in our study differed in their capability for the detection of patients with pathogenic CNVs (6.3 % of samples genotyped with the Cytogenetics 2.7M array *versus* 12.5 % of samples genotyped with the CytoScan HD array; $P = 0.0550$, Fisher's exact test), highlighting the importance of array design on the diagnostic yield of chromosomal microarray analysis. This difference even reached statistical significance when not only causative but also likely causative CNVs were considered (7.1 % of samples from Group 1 *versus* 15.4 % of samples from Group 2; $P = 0.0179$, Fisher's exact test). In that sense, Rodriguez-Revenga et al. [2013] found an overall diagnostic yield of 15 % obtained with three different microarray platforms, one of them a customized whole genome oligonucleotide array, in 200 Spanish patients with DD/ID. However, differences between platforms were noted, with the custom microarray detecting less common CNVs and resulting more advantageous in a clinical setting (Rodriguez-Revenga et al. 2013). Taken together, these findings highlighting the importance of array design on the diagnostic yield of chromosomal microarray analysis.

In our sample, thirteen out of the 64 (20.3 %) patients with a conclusive genetic diagnosis carried more than one chromosomal aberrations in their genomes. Interestingly, three of them presented two causal CNVs, while the remaining patients combined the pathogenic aberration with a benign CNV ($n = 2$) or a variant of unclear relevance ($n = 8$; one of them carrying a third variant considered benign). Previous studies on ID cohorts (Bartnik et al. 2013; Battaglia et al. 2013) had already found evidences consistent with the two-hit hypothesis suggested for neurodevelopmental disorders (Girirajan et al. 2010). The interpretation of these genetic findings is far from being easy and is especially complicated if the genotype includes a known genomic disorder characterized by incomplete penetrance and variable expressivity in combination with a CNV of unknown clinical significance or when each individual variant was reported to cause overlapping phenotypes [(Quintela et al. 2015e); ARTÍCULO IV].

5. Conclusions

Overall, we have evaluated the usefulness of genome-wide high density SNP microarrays in the detection of clinically relevant CNVs in a cohort of 573 Galician patients with ID. Our strategy allowed us the identification of 186 rare exonic chromosomal imbalances -classified as clinically relevant (36.0 %), of unknown clinical significance (50.0 %) and benign (14.0 %)- in 159 (27.7 %) patients. Supporting once more the relevance of performing chromosomal microarray analysis for the detection of causative CNVs in ID, our diagnostic yield ranged from 11.2 % to

13.6 %. Additionally, we have provided clinical descriptions and molecular data of several patients with clinically relevant chromosomal aberrations and/or variants of uncertain clinical significance, confirming that ID is a genetically heterogeneous disorder.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their collaboration. Genotyping services were provided by the “Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos - Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCIII)” (Grant PRB2 (IPT13/0001 - ISCIII-SGEFI / FEDER)).





FIGURE AND TABLES

Figure I: Rare exonic CNVs identified in our ID patients. Rare exonic CNVs (n=186) identified in our total cohort of 573 patients with ID. The number and percentage of events are in parentheses.

Table I: Sample distribution (by platform and gender) and quality control. Group 1: Samples genotyped with the Affymetrix CytoGenetics 2.7M array. **Group 2:** Samples genotyped with the Affymetrix CytoScan HD array. QC Filter 1: Patients excluded after QC filtering based on MAPD and SNP-QC scores. QC Filter 2: Siblings of probands. QC Filter 3: Patients with CNVs longer than 7.5 Mb, long runs of LOH (loss of heterozygosity) or clinically recognizable syndromes. **Abbreviations:** QC: Quality Control; M: Male; F: Female.

Table II. Microarray-based copy number variation analysis. Group 1: Samples genotyped with the Affymetrix CytoGenetics 2.7M array. **Group 2:** Samples genotyped with the Affymetrix CytoScan HD array. **Abbreviations:** CNVs: Copy Number Variant; CN: Copy Number; M: Male; F: Female.

Table III: Clinically relevant CNVs sorted by chromosome. (*) Age at diagnosis. (**) Variants of unknown clinical significance and benign CNVs present in these patients are shown in grey. (***) A: *Known genomic disorder*; B: *Telomeric rearrangement*; C: *Different-sized pathogenic CNV* and D: *Monogenic exonic CNV disrupting an ID and/or ASD gene*. (****) OMIM genes are shown in bold. (1) Confirmed by karyotype as an unbalanced product of a paternal translocation [46,XY, t(8;9)(p23;q32)]. **Abbreviations:** y:years; m: months; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: CytoGenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; GDD: global developmental delay; P1: patient 1; P2: patient 2; S: syndromic; ASD: autism spectrum disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table IV: CNVs of unknown clinical significance sorted by category (A: *Likely pathogenic CNVs*. B: *Non-subclassified CNVs*. C: *Likely benign CNVs*) and chromosome.(*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). (2) Patient with an additional variant of unknown clinical significance ((shown in grey). (3) Patient with an additional clinically relevant CNV and a benign CNV (both shown in grey). (4) Patient with an additional benign CNV (shown in grey). **Abbreviations:** y:years; m: months; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: CytoGenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ASD: autism spectrum disorder; GDD: global developmental delay; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; P2: patient 2; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table V: Benign CNVs sorted by chromosome. (*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (***) *RELN (reelin; OMIM 600514)* encodes a large glycoprotein with important roles in neuronal migration and positioning in the developing brain. This gene is reported to segregate in an autosomal recessive manner, with homozygous mutations causing lissencephaly (OMIM 257320), accompanied by developmental delay and epilepsy. Although with inconsistent results, *RELN* has been

frequently analyzed by association studies in various disorders, especially schizophrenia and ASD (reviewed by (Folsom and Fatemi 2013; Lammert and Howell 2016) and recent whole exome/genome sequencing studies have detected *de novo* mutations in this gene in ASD patients (Neale et al. 2012; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Yuen et al. 2015). (****) Homozygous mutations in the *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*; OMIM 601385) gene, both SNVs and CNVs, have been reported in multiple consanguineous ID families (Garshasbi et al. 2008; Molinari et al. 2008; Garshasbi et al. 2011; Khan et al. 2011; Loddo et al. 2013; El Chehadeh et al. 2015; Al-Amri et al. 2016) and although we did not find additional deleterious mutations in the other allele (data not shown), we cannot exclude the presence of mutations in regulatory elements within the non-exonic sequence. (1) Patient with an additional variant of unknown clinical significance (shown in grey). (2) Patient with an additional clinically relevant CNV and a variant of unknown clinical significance (both shown in grey). (3) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). **Abbreviations:** y:years; NA: not available; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: Cytogenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ASD: autism spectrum disorder; GDD: global developmental delay; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.



Figure I: Rare exonic CNVs identified in our ID patients. Rare exonic CNVs (n=186) identified in our total cohort of 573 patients with ID. The number and percentage of events are in parentheses.

Rare exonic CNVs (n=186)

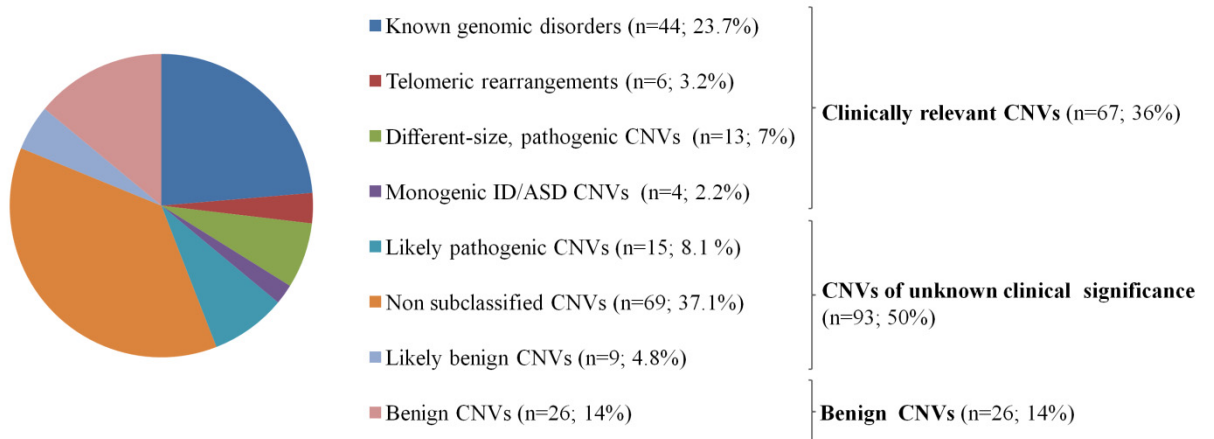




Table I: Sample distribution (by platform and gender) and quality control.

	Group 1			Group 2			TOTAL		
	TOTAL	M	F	TOTAL	M	F	TOTAL	M	F
Initial sample	143	82	61	482	293	189	625	375	250
QC filter 1	7 (4.9 %)	3	4	17 (3.5 %)	9	8	24 (3.8 %)	12	12
QC filter 2	3 (2.1 %)	2	1	10 (2.1 %)	7	3	13 (2.1 %)	9	4
QC filter 3	7 (4.9 %)	3	4	8 (1.6 %)	5	3	15 (2.4 %)	8	7
Final sample	126	74	52	447	272	175	573	346	227

Group 1: Samples genotyped with the Affymetrix CytoGenetics 2.7M array. **Group 2:** Samples genotyped with the Affymetrix CytoScan HD array. QC Filter 1: Patients excluded after QC filtering based on MAPD and SNP-QC scores. QC Filter 2: Siblings of probands. QC Filter 3: Patients with CNVs longer than 7.5 Mb, long runs of LOH (loss of heterozygosity) or clinically recognizable syndromes. **Abbreviations:** QC: Quality Control; M: Male; F: Female.

Table II. Microarray-based copy number variation analysis.

	Group 1			Group 2			TOTAL		
	TOTAL	M	F	TOTAL	M	F	TOTAL	M	F
Patients with rare exonic CNVs	27/126 (21.4 %)	17/74 (23.0 %)	10/52 (19.2 %)	132/447 (29.5 %)	84/272 (30.9 %)	48/175 (27.4 %)	159/573 (27.7 %)	101/346 (29.2 %)	58/227 (25.5 %)
Patients with more than 1 rare exonic CNV	6/126 (4.8 %)	3/74 (4.0 %)	3/52 (5.8 %)	20/447 (4.5 %)	12/272 (4.4 %)	8/175 (4.6 %)	26/573 (4.5 %)	15/346 (4.3 %)	11/227 (4.8 %)
Number of rare exonic CNVs	33	20	13	153	97	56	186	117	69
Rare exonic CN gains	19/33 (57.6 %)	12/20 (60.0 %)	7/13 (53.8 %)	91/153 (59.5 %)	59/97 (60.8 %)	32/56 (57.1 %)	110/186 (59.1 %)	71/117 (60.7 %)	39/69 (56.5 %)
Rare exonic CN losses	14/33 (42.4 %)	8/20 (40.0 %)	6/13 (46.1 %)	62/153 (40.5 %)	38/97 (39.2 %)	24/56 (42.9 %)	76/186 (40.9 %)	46/117 (39.3 %)	30/69 (43.5 %)

Group 1: Samples genotyped with the Affymetrix Cytogenetics 2.7M array. **Group 2:** Samples genotyped with the Affymetrix CytoScan HD array.

Abbreviations: CNVs: Copy Number Variant; CN: Copy Number; M: Male; F: Female.

Table III: Clinically relevant CNVs sorted by chromosome.

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ID_127	13y	HD	F	ID, ADHD, hyperphagia, facial dysmorphic features, arachnodactyly, scoliosis, myopia, astigmatism	arr[hg19] 1p36.33(849,466-2,098,337)x1 no mat, 4q32.1(156,759,265-157,037,360)x1 mat	B	1,248,871	54 genes (<i>AGRN, GABRD</i>)
						-	278,095	<i>ACCN5, TDO2, CTSO</i>
ID_331	11y	HD	M	ID, ADHD, dislexy, facial dysmorphic features	arr[hg19] 1p13.3p13.2(110,098,042-114,592,380)x1 no mat	C	4,494,338	67 genes (<i>GNAT2, ALX3, RBM15, SLC16A1, PTPN22</i>)
ID_405	13y	HD	F	ID, facial dysmorphic features	arr[hg19] 1q21.1q21.2(145,041,051-147,830,830)x3	A	2,789,779	35 genes (<i>GJA5, GJA8</i>)
ID_302	15y	HD	M	ID (mild), behavior problems	arr[hg19] 1q21.1(145,382,123-145,809,279)x3, 14q31.3(89178732-89470570)x3	A	427,156	17 genes
						-	291,838	<i>EML5, TTC8</i>
ID_402	4y	HD	M	GDD, short stature	arr[hg19] 1q21.1q21.2(146,156,348-147,929,323)x1, 12p12.1(21,300,476-21,578,259)x3	A	1,772,975	15 genes (<i>GJA5, GJA8</i>)
						-	277,783	<i>SLC01B1, SLC01A2, IAPP</i>
ID_567	11y	2.7	M	See [Perez-Gay et al. 2013]	arr[hg19] 2q22.3q23.3(148,173,639-151,159,692)x1 dn	A	2,986,053	<i>ACVR2A, ORC4, MBD5, EPC2, KIF5C, MIR1978, LYPD6B, LYPD6, MMADHC</i>
ID_439	15y	HD	M	ID	arr[hg19] 3p26.2p26.1(2,868,037-4,239,953)x1	C	1,371,916	<i>CNTN4, IL5RA, TRNT1, CRBN, LRRN1</i>
ID_52	9y	HD	F	ID	arr[hg19] 3p14.1p13(66,591,361-71,086,614)x1 dn	C	4,495,253	14 genes (<i>MITF</i>)
ID_109	13y	HD	F	See P1 [Quintela et al. 2015b]	arr[hg19] 3q29(195,690,227-197,356,334)x1 no mat	A	1,666,107	25 genes (<i>RNF168</i>)
ID_245	10y	HD	M	See P2 [Quintela et al. 2015b]	arr[hg19] 3q29(195,718,745-197,344,176)x3	A	1,625,431	24 genes (<i>RNF168</i>)
ID_191	9y	HD	M	See P1 [Quintela et al. 2015d]	arr[hg19] 4q13.1q13.2(65,736,024-69,582,428)x1 mat	C	3,846,404	20 genes (<i>GNRHR</i>)
ID_533	11y	2.7	F	See P2 [Quintela et al. 2015d]	arr[hg19] 4q13.2q13.3(68,207,272-75,021,494)x1 dn, 11q24.2(126,463,132-126,677,128)x3 mat	C	6,814,222	72 genes (<i>GNRHR, MUC7, ENAM, SLC4A4, ALB, AFP</i>)
						-	213,996	<i>KIRREL3</i>
ID_535	17y	2.7	M	ID	arr[hg19] 5p13.1p11(39,020,746-46,116,143)x3 mat	C	7,095,397	35 genes (<i>C9, C7, C6, OXCT1, GHR, FGF10</i>)
ID_335	12y	HD	M	ID, obsessive and compulsive behaviors, facial dysmorphic features	arr[hg19] 6q27(169,367,047-170,919,482)x1	B	1,552,435	14 genes (<i>THBS2, TBP</i>)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ID_114	11y	HD	M	S-ID, communicating hydrocephalus, facial dysmorphic features, macrocephaly	arr[hg19] 7q11.23(72,536,979-74,298,268)x3 dn	A	1,761,289	34 genes (<i>ELN, NCF1</i>)
ID_123	10y	HD	M	ID, ADHD, macrosomia	arr[hg19] 4p15.33(11,870,242-12,230,025)x1 no mat, 7q11.23(72,718,277-74,142,215)x3 no mat	- A	359,783 1,423,938	<i>LOC101929019</i> 28 genes (<i>ELN</i>)
ID_471	14y	2.7	F	ID (severe), disruptive behaviors, ASD	arr[hg19] 8p23.3p23.1(172,851-7,556,993)x1	B (1)	7,384,142	46 genes (<i>CLN8, ARHGEF10, MCPH1</i>)
ID_557	13y	HD	M	ID	arr[hg19] 8p22p21.3(16,024,178-23,207,684)x3 dn	C	7,183,506	60 genes (<i>MSR1, FGF20, PDGFRL, PCM1, NAT1, NAT2, LPL, LZTS1, HR, SFTPC, TNFRSF10B</i>)
ID_474	9y	2.7	M	See [Quintela et al. 2015c]	arr[hg19] 8q21.11q21.13(74,834,763-81,904,679)x1 no mat	A	7,069,916	23 genes (<i>TMEM70, GDAP1, ZFHX4, PEX2</i>)
ID_282	7y	HD	F	ID, feeding problems, obesity	arr[hg19] 9q33.3q34.13(129,056,596-134,070,668)x3	C	5,014,072	93 genes (<i>LMX1B, STXBP1, ENG, AK1, SLC27A4, GLE1, LRRC8A, CRAT, TOR1A, ASS1, ABL1, NUP214</i>)
ID_27	15y	HD	M	ID, ADHD	arr[hg19] 9q34.2q34.3(136,222,628-141,020,389)x3, 17p13.3(525-238,565)x1	B B	4,797,761 238,040	121 genes (<i>SURF1, ADAMTS13, ADAMTSL2, DBH, SARDH, COL5A1, LHX3, INPP5E, NOTCH1, AGPAT2, TPRN, SLC34A3, NELF, EHMT1</i>) <i>DOC2B, RPH3AL</i>
ID_62	11y	HD	M	ID	arr[hg19] 9q34.3(140,366,401-140,672,397)x1, 10q23.2(88,581,432-88,722,185)x3	C -	305,996 140,753	<i>PNPLA7, MRPL41, WDR85, ZMYND19, ARRDC1, C9orf37, EHMT1, FLJ40292</i> <i>BMPRI1, MMRN2, SNCG</i>
ID_460	15y	HD	M	ID, behaviour problems, sleep disturbances, obsessive behaviors	arr[hg19] 10q22.2q22.3(75,498,936-79,284,250)x3, 15q13.3(32,003,537-32,444,044)x3	C -	3,785,314 440,507	21 genes (<i>PLAU, VCL, KCNMA1</i>) <i>CHRNA7</i>
ID_45	15y	HD	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 12p13.33(2,366,516-2,571,012)x1	D	204,496	<i>CACNA1C</i>
ID_358	11m	HD	M	GDD (mild), facial dysmorphic features, perinatal ponderal delay	arr[hg19] 12p12.2p11.23(21,000,550-27,266,871)x1 dn	C	6,266,321	38 genes (<i>GYS2, LDHB, KCNJ8, ABCC9, BCAT1, KRAS, BHLHE41</i>)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ID_475	11y	2.7	M	ID	arr[hg19] 14q32.2q32.31(100,434,326-101,498,362)x1	A	1,064,036	73 genes
ID_159	11y	HD	M	ID, ADHD, epicanthus	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,282,799)x1 mat	A	512,378	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ID_168	14y	HD	F	ID, behaviour disorder	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,282,905)x1 mat	A	512,484	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ID_270	3y	HD	M	GDD, ASD	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,282,799)x1 mat	A	512,378	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ID_348	14y	HD	F	ID	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,082,328)x1	A	311,907	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1</i>
ID_466	1y	HD	M	GDD	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,288,350)x3	A	517,929	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ID_337	12y	HD	M	ID, epilepsy	arr[hg19] 15q11.2q13.1(23,615,768-28,560,664)x3	A	4,944,896	101 genes
ID_180	10y	HD	F	ID, ASD, macrocephaly	arr[hg19] 15q13.1q13.3(29,010,255-32,444,196)x1	A	3,433,941	19 genes (<i>TRPM1, CHRNA7</i>)
ID_325	15y	HD	M	ID, short stature	arr[hg19] 3p22.3p22.3(34,900,399-35,543,442)x1 pat,	-	643,043	<i>LOC101928135</i>
					3q26.31(175,418,935-175,677,422)x3 mat,	-	258,487	<i>NAALADL2</i>
					15q13.2q13.3(30,370,017-32,444,261)x3 pat	A	2,074,244	14 genes (<i>TRPM1, CHRNA7</i>)
ID_195	5m	HD	M	GDD, hypotonia, feeding problems	arr[hg19] 15q13.2q13.3(30,386,398-32,446,830)x1 dn	A	2,060,432	14 genes (<i>TRPM1, CHRNA7</i>)
ID_283	5y	HD	M	ID, ADHD, epicanthus, pes planus	arr[hg19] 15q13.2q13.3(31,073,735-32,914,239)x1	A	1,840,504	12 genes (<i>TRPM1, CHRNA7</i>)
ID_376	2y	HD	M	GDD (mild), facial dysmorphic features	arr[hg19] 6p25.3p25.2(1,875,823-2,566,056)x1,	-	690,233	<i>GMDS</i>
					15q13.2q13.3(31,073,735-32,444,044)x3	A	1,370,309	<i>FAN1, MTMR10, TRPM1, MIR211, KLF13, OTUD7A, CHRNA7</i>
ID_6	5y	2.7	M	See [Quintela et al. 2015e]	arr[hg19] 12p12.1(23,769,086-24,262,524)x1 dn, 16p13.11p12.3(15,286,149-18,771,863)x3 mat	D A	493,438 3,485,714	<i>SOX5</i> 20 genes (<i>MYH11, ABCC6, XYL1</i>)
ID_339	4y	HD	M	ID, severe language disorder	arr[hg19] 16p12.2(21,761,404-22,431,357)x3 mat	A	669,953	<i>OTOA, RRN3P1, UQCRC2, PDZD9, C16orf52, VWA3A, EEF2K, POLR3E, CDR2, RRN3P3</i>
ID_444	8y	HD	M	ID, microcephaly	arr[hg19] 16p12.2(21,801,889-22,431,357)x1	A	629,468	<i>RRN3P1, UQCRC2, PDZD9, C16orf52, VWA3A, EEF2K, POLR3E, CDR2, RRN3P3</i>
ID_134	13y	HD	M	ID	arr[hg19] 16p11.2(29,412,891-30,240,227)x3	A	827,336	41 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_412	2y	HD	M	GDD, dysmorphic features	arr[hg19] 16p11.2(29,412,891-30,321,320)x3	A	908,429	42 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ID_28	13y	HD	F	ID, language delay	arr[hg19] 4q33(170,610,585-170,833,785)x3 mat, 16p11.2(29,567,295-30,177,916)x1 dn	- A	223,200 610,621	<i>CLCN3, C4orf27</i> 30 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_144	10y	HD	M	ID	arr[hg19] 16p11.2(29,567,295-30,177,916)x1	A	610,621	30 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_225	11y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] 16p11.2(29,567,295-30,177,916)x1 dn	A	610,621	30 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_355	7y	HD	F	ID (mild)	arr[hg19] 16p11.2(29,567,295-30,321,320)x3 no mat	A	754,025	42 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_433	15y	HD	F	ID, ADHD	arr[hg19] 16p11.2(29,580,020-30,177,999)x1	A	597,979	29 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_364	9y	HD	F	ID (moderate), ADHD combined type	arr[hg19] 5p15.31p15.2(8,770,080-11,221,171)x1 pat, arr[hg19] 16p11.2(29,580,020-30,240,227)x3 mat	C A	2,451,091 660,207	12 genes (<i>CCT5, CTNND2</i>) 40 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_498	4y	HD	M	S-ID (moderate), ASD	arr[hg19] 16p11.2(29,591,078-30,177,240)x3	A	586,162	29 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_206	7y	HD	M	ID, holoprosencephaly	arr[hg19] 16p11.2(29,615,948-30,177,240)x3 mat	A	561,292	29 genes (<i>MVP, ALDOA</i>)
ID_96	5y	HD	M	S-ID, ASD	arr[hg19] 17p12(14,068,764-15,484,858)x1 mat	A	1,416,094	<i>COX10, CDRT15, HS3ST3B1, MGC12916, CDRT7, PMP22, TEKT3, CDRT4, FAM18B2</i>
ID_126	4y	HD	M	S-ID (mild)	arr[hg19] 17p11.2(16,761,814-20,323,919)x3	A	3,562,105	58 genes (<i>TNFRSF13B, FLCN, RAI1, ATPAF2, MYO15A, ALDH3A2, AKAP10</i>)
ID_265	12y	HD	F	ID	arr[hg19] 17q12(34,440,082-36,300,630)x3 no mat	A	1,860,548	27 genes (<i>CCL3L1, ACACA, HNF1B</i>)
ID_580	2y	2.7	M	GDD, multiple congenital anomalies	arr[hg19] 17q21.2q21.32(39,941,467-45,563,881)x3 dn	A	5,622,414	146 genes (20 OMIM genes)
ID_122	6y	HD	F	ID, psychomotor delay, epileptic encephalopathy, microcephaly	arr[hg19] 22q11.21(18,648,866-21,465,659)x3 mat	A	2,816,793	61 genes (<i>PRODH, DGCR2, GP1BB, TBX1, COMT, RTN4R, SERPIND1, SNAP29</i>)
ID_377	8y	HD	M	ID, ADHD, dysmorphic features	arr[hg19] 22q11.21(18,644,790-21,798,907)x1 no pat	A	3,154,117	65 genes (<i>PRODH, DGCR2, GP1BB, TBX1, COMT, RTN4R, SERPIND1, SNAP29</i>)
ID_167	6y	HD	M	ID (profound), ASD, epilepsy, cryptorchidism	arr[hg19] 22q11.21(18,916,842-21,465,659)x3 dn	A	2,548,817	58 genes (<i>PRODH, DGCR2, GP1BB, TBX1, COMT, RTN4R, SERPIND1, SNAP29</i>)
ID_176	16y	HD	M	ID (mild), microcephaly, facial dysmorphic features	arr[hg19] 22q11.21(18,916,842-20,312,661)x3	A	1,395,819	37 genes (<i>PRODH, DGCR2, GP1BB, TBX1, COMT</i>)
ID_198	6y	HD	F	ID, epilepsy, ASD, hyperactivity, facial dysmorphic features	arr[hg19] 22q11.21(18,916,842-20,311,904)x1 dn	A	1,395,062	37 genes (<i>PRODH, DGCR2, GP1BB, TBX1, COMT, RTN4R</i>)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ID_468	1y	HD	F	GDD, facial dysmorphic features	arr[hg19] 22q11.21(18,916,842-21,465,659)x1	A	2,548,817	58 genes (<i>PRODH</i> , <i>DGCR2</i> , <i>GP1BB</i> , <i>TBX1</i> , <i>COMT</i> , <i>RTN4R</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i>)
ID_350	12y	HD	M	ID, dysruptive behaviors	arr[hg19] 22q13.31q13.33(48,160,896-51,183,870)x1 dn	B	3,022,974	41 genes (<i>ALG12</i> , <i>MLC1</i> , <i>SCO2</i> , <i>TYMP</i> , <i>SHANK3</i> , <i>ACR</i>)
ID_166	12y	HD	F	See [Quintela et al. 2015a]	arr[hg19] Xp22.12(20,173,856-20,360,913)x1 no mat	D	187,057	RPS6KA3
ID_212	6m	HD	M	GDD, renal agenesis, preputial agenesis	arr[hg19] Xq11.1q13.1(62,406,864-67,900,712)x2 mat	C	5,493,848	20 genes (<i>ARHGEF9</i> , <i>FAM123B</i> , <i>AR</i> , <i>OPHN1</i>)
ID_401	6y	HD	M	See Supplemental Data	arr[hg19] Xq25(122,312,033-122,593,583)x2	D	281,550	GRIA3

(*) Age at diagnosis. (**) Variants of unknown clinical significance and benign CNVs present in these patients are shown in grey. (***) A: *Known genomic disorder*; B: *Telomeric rearrangement*; C: *Different-sized pathogenic CNV* and D: *Monogenic exonic CNV disrupting an ID and/or ASD gene*. (****) OMIM genes are shown in bold. (1) Confirmed by karyotype as an unbalanced product of a paternal translocation [46,XY,t(8;9)(p23;q32)]. **Abbreviations:** y:years; m: months; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: Cytogenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; GDD: global developmental delay; P1: patient 1; P2: patient 2; S: syndromic; ASD: autism spectrum disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.



Table IV: CNVs of unknown clinical significance sorted by category (A: Likely pathogenic CNVs. B: Non-subclassified CNVs. C: Likely benign CNVs) and chromosome.

A: Likely pathogenic CNVs (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_295	15y	HD	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 1q41(218,432,883-220,940,873)x1 mat	2,507,990	16 genes (<i>RAB3GAP2</i>)
ID_409	12y	HD	M	ID (mild)	arr[hg19] 2q12.2q12.3(106,853,263-108,440,756)x1	1,587,493	<i>PLGLA, RGPD3, ST6GAL2, LOC729121</i>
ID_210	17y	HD	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 2q36.3(230,742,418-230,846,708)x1	104,290	<i>TRIP12, FBX036</i>
ID_354	12y	HD	F	ID, hypotonia, difficulties in motor skills, social interaction problems	arr[hg19] 3q29(196,535,850-197,660,039)x3 mat	1,124,189	14 genes
ID_237	17y	HD	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 4q31.23(148,694,448-149,325,972)x1	631,524	<i>ARHGAP10, NR3C2</i>
ID_460 (1)	15y	HD	M	ID, behaviour problems, sleep disturbances, obsessive behaviors	arr[hg19] 10q22.2q22.3(75,498,936-79,284,250)x3, 15q13.3(32,003,537-32,444,044)x3	440,507	<i>CHRNA7</i>
ID_469 (2)	12y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] 15q13.3(32,003,537-32,446,830)x3, 15q24.3q25.1(78,232,021-78,586,944)x3	443,293	<i>CHRNA7</i>
ID_459	7y	HD	M	ID, psychomotor delay, myoclonic epilepsy, behaviour problems	arr[hg19] 15q13.3(32,011,458-32,444,044)x3	432,586	<i>CHRNA7</i>
ID_33	4y	HD	F	GDD, mild language delay, facial dysmorphic features, adenoidal hypertrophy, hyperreflexia	arr[hg19] 15q13.3(32,011,475-32,446,830)x3	435,355	<i>CHRNA7</i>
ID_414	4y	HD	M	GDD, joint hypermobility, accelerated growth	arr[hg19] 15q13.3(32,020,432-32,439,524)x3	419,092	<i>CHRNA7</i>
ID_294	1y	HD	F	GDD	arr[hg19] 15q13.3(32,020,432-32,444,044)x3	423,612	<i>CHRNA7</i>
ID_486 (2)	9y	2.7	F	See Supplemental Data	arr[hg19] 11q22.3(10,8764,087-109,157,117)x3, 19q13.32q13.33(47,678,453-48,404,515)x3	726,062	22 genes (<i>CRX</i>)
ID_427	4y	HD	F	See Supplemental Data	arr[hg19] 20q12q13.11(40,946,119-42,040,938)x3	1,094,819	<i>PTPRT</i>
ID_305 (2)	10y	HD	M	ID (mild), ADHD	arr[hg19] 4q28.1(126,286,442-126,508,782)x3 mat, 22q11.21(20,728,956-21,465,659)x3 mat	736,703	19 genes (<i>SERPIND1, SNAP29</i>)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_382	13y	HD	M	ID, clumsiness, triangular face shape	arr[hg19] 22q11.21(20,728,956-21,465,659)x3	736,703	19 genes (<i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i>)

B: *Non-subclassified CNVs* (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_517 (2)	6y	2.7	F	ID	arr[hg19] 1p36.13p36.12(19,269,287-21,689,202)x3, 1q23.1(158,489,643-158,892,963)x1	2,419,915	35 genes (<i>PLA2G2A</i> , <i>PINK1</i> , <i>ECE1</i>)
ID_12	4y	HD	F	ID	arr[hg19] 1q23.1(158,489,545-158,901,127)x1	411,582	11 genes (<i>SPTA1</i>)
ID_517 (2)	6y	2.7	F	ID	arr[hg19] 1p36.13p36.12(19,269,287-21,689,202)x3, 1q23.1(158,489,643-158,892,963)x1	403,320	11 genes (<i>SPTA1</i>)
ID_600	3y	2.7	M	GDD, ASD	arr[hg19] 2p15(61,616,652-61,965,215)x3	348,563	<i>USP34</i> , <i>SNORA70B</i> , <i>XPO1</i>
ID_590	2y	2.7	M	GDD, ASD	arr[hg19] 2q22.3(145,430,864-146,795,515)x1	1,364,651	<i>DKFZp68601327</i>
ID_88	9y	HD	M	ID, epilepsy	arr[hg19] 2q24.2(159,963,476-160,249,119)x3	285,643	<i>TANC1</i> , <i>WDSUB1</i> , <i>BAZ2B</i>
ID_230	10y	HD	M	ID, ASD, hiperactivity, facial dysmorphic features	arr[hg19] 3p14.1(65,502,771-66,372,903)x3	870,132	<i>MAGI1</i> , <i>SLC25A26</i>
ID_611	1y	2.7	M	GDD	arr[hg19] 3p12.3(79,450,459-79,615,786)x1 mat	165,327	<i>ROBO1</i>
ID_137	15y	HD	F	ID, epilepsy	arr[hg19] 3p12.2p12.1(80,726,889-83,556,891)x3	2,830,002	<i>GBE1</i>
ID_560 (2)	5y	2.7	M	ID	arr[hg19] 3q23(139,182,418-139,828,239)x3, 10q24.2(100,704,687-100,912,452)x1	645,821	<i>RBP2</i> , <i>RBP1</i> , <i>NMNAT3</i> , <i>CLSTN2</i>
ID_325 (3)	15y	HD	M	ID, short stature	arr[hg19] 3p22.3p22.3(34,900,399-35,543,442)x1 pat, 3q26.31(175,418,935-175,677,422)x3 mat, 15q13.2q13.3(30,370,017-32,444,261)x3 pat	258,487	<i>NAALADL2</i>
ID_305 (2)	10y	HD	M	ID (mild), ADHD	arr[hg19] 4q28.1(126,286,442-126,508,782)x3 mat, 22q11.21(20,728,956-21,465,659)x3 mat	222,340	<i>FAT4</i> , <i>MIR2054</i>
ID_515	6y	2.7	M	ID	arr[hg19] 4q28.1(126,313,127-126,729,089)x1	415,962	<i>FAT4</i> , <i>MIR2054</i>

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_127 (1)	13y	HD	F	ID, ADHD, hyperphagia, facial dysmorphic features, arachnodactyly, scoliosis, myopia, astigmatism	arr[hg19] 1p36.33(849,466-2,098,337)x1 no mat, 4q32.1(156,759,265-157,037,360)x1 mat	278,095	<i>ACCN5, TDO2, CTSO</i>
ID_376 (1)	2y	HD	M	GDD (mild), facial dysmorphic features	arr[hg19] 6p25.3p25.2(1,875,823-2,566,056)x1, 15q13.2q13.3(31,073,735-32,444,044)x3	690,233	<i>GMDS</i>
ID_221	3y	HD	M	GDD, language delay	arr[hg19] 6p22.1(27,166,546-27,401,326)x3	234,780	<i>PRSS16, POM121L2, FKSG83, ZNF204P, ZNF391</i>
ID_234	11y	HD	M	ID (mild), ADHD, TDAH, facial dysmorphic features, dextrocardia	arr[hg19] 6p22.1(27,166,546-27,401,326)x3	234,780	<i>PRSS16, POM121L2, FKSG83, ZNF204P, ZNF391</i>
ID_26	9y	HD	F	ID, facial dysmorphic features	arr[hg19] 6p12.3(50,458,177-51,039,485)x3	581,308	<i>TFAP2D, TFAP2B</i>
ID_529	5y	2.7	F	ID	arr[hg19] 6q12(65,471,052-65,778,087)x1	307,035	<i>EYS</i>
ID_32 (2)	2y	HD	F	GDD	arr[hg19] Xq21.2q21.31(85,632,742-86,633,326)x3, 6q23.2q23.3(135,086,901-136,136,872)x1	1,049,971	<i>ALDH8A1, HBS1L, MYB, AHI1, NCRNA00271</i>
ID_67	12y	HD	F	ID, ASD	arr[hg19] 6q27(170,168,308-170,548,295)x3	379,987	<i>C6orf70, NCRNA00242, C6orf208</i>
ID_10	3y	2.7	F	GDD, language delay, macrocephaly	arr[hg19] 7p15.2(27,641,030-27,743,147)x1	102,117	<i>HIBADH</i>
ID_390	10y	HD	F	ID	arr[hg19] 8q11.23(53,861,674-54,347,340)x3	485,666	<i>OPRK1</i>
ID_54 (2)	6y	HD	M	ID, language delay, facial dysmorphic features	arr[hg19] 8q13.2(68,646,303-69,221,734)x3, 19q13.31(44,360,203-44,520,095)x1	575,431	<i>CPA6, PREX2</i>
ID_157 (2)	5y	HD	F	ID, psychomotor and language delay, visuospatial deficits	arr[hg19] Xq23(111,626,803-112,087,404)x3, 9q21.32q21.33(86,844,451-87,089,584)x3	245,133	<i>SLC28A3</i>
ID_238	7y	HD	M	ID	arr[hg19] 9q21.32q21.33(86,845,673-87,089,584)x3	243,911	<i>SLC28A3</i>
ID_366	2y	HD	M	GDD, deficient intersubjectivity, ptosis, congenital heart disease	arr[hg19] 9q31.1(104,478,982-104,742,371)x3	263,389	<i>GRIN3A</i>
ID_62 (1)	11y	HD	M	ID	arr[hg19] 9q34.3(140,366,401-140,672,397)x1, 10q23.2(88,581,432-88,722,185)x3	140,753	<i>BMPR1A, MMRN2, SNCG</i>
ID_482	5y	HD	M	ID	arr[hg19] 10q24.2(100,690,060-100,908,650)x1	218,590	<i>HPSE2</i>
ID_560 (2)	5y	2.7	M	ID	arr[hg19] 3q23(139,182,418-139,828,239)x3, 10q24.2(100,704,687-100,912,452)x1	207,765	<i>HPSE2</i>
ID_323	11y	HD	F	ID, epileptic encephalopathy	arr[hg19] 10q26.2(127,744,011-128,127,150)x3	383,139	<i>ADAM12, C10orf90</i>
ID_340	6y	HD	M	ID, language delay, social interaction problems	arr[hg19] 10q26.2(127,744,011-128,128,774)x3	384,763	<i>ADAM12, C10orf90</i>

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_322 (2)	17y	HD	F	ID, facial dysmorphic features, short stature, polycystic ovary	arr[hg19] 10q26.2(127,744,011-128,139,793)x3, 15q11.2(24,839,156-24,988,449)x3	395,782	<i>ADAM12, C10orf90</i>
ID_397	10y	HD	M	ID	arr[hg19] 11q14.2(86,843,373-87,311,096)x3 mat	467,723	<i>TMEM135</i>
ID_486 (2)	9y	2.7	F	See Supplemental Data	arr[hg19] 11q22.3(10,8764,087-109,157,117)x3, 19q13.32q13.33(47,678,453-48,404,515)x3	393,030	<i>DDX10</i>
ID_533 (1)	8y	2.7	F	See P2 [Quintela et al. 2015d]	arr[hg19] 4q13.2q13.3(68,207,272-75,021,494)x1 dn, 11q24.2(126,463,132-126,677,128)x3 mat	213,996	<i>KIRREL3</i>
ID_402 (1)	4y	HD	M	GDD, short stature	arr[hg19] 1q21.1q21.2(146,156,348-147,929,323)x1, 12p12.1(21,300,476-21,578,259)x3	277,783	<i>SLCO1B1, SLCO1A2, IAPP</i>
ID_508 (2)	7y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] 12q14.1(59,257,222-59,761,500)x1, 16p12.2(21,576,802-21,816,543)x1	504,278	<i>LRIG3</i>
ID_72	8y	HD	M	ID	arr[hg19] 14q21.2q21.3(47,121,024-47,445,704)x3	324,680	<i>RPL10L, MDGA2</i>
ID_124	12y	HD	M	ID, facial dysmorphic features	arr[hg19] 14q31.3(89,164,003-89,464,360)x3	300,357	<i>EML5, TTC8</i>
ID_302 (1)	15y	HD	M	ID (mild), behavior problems	arr[hg19] 1q21.1(145,382,123-145,809,279)x3, 14q31.3(89178732-89470570)x3	291,838	<i>EML5, TTC8</i>
ID_322 (2)	17y	HD	F	ID, facial dysmorphic features, short stature, polycystic ovary	arr[hg19] 10q26.2(127,744,011-128,139,793)x3, 15q11.2(24,839,156-24,988,449)x3	149,293	<i>C15orf2</i>
ID_469 (2)	12y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] 15q13.3(32,003,537-32,446,830)x3, 15q24.3q25.1(78,232,021-78,586,944)x3	354,923	<i>LOC91450, TBC1D2B, SH2D7, CIB2, IDH3A, ACSBG1, DNAJA4, WDR61</i>
ID_505	6y	HD	F	ID, epilepsy	arr[hg19] 15q25.2(81,975,128-82,435,727)x1 mat	460,599	<i>MEX3B, EFTUD1</i>
ID_508 (2)	7y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] 12q14.1(59,257,222-59,761,500)x1, 16p12.2(21,576,802-21,816,543)x1	239,741	<i>METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>
ID_287	7y	HD	M	ID, ADHD, microcephaly	arr[hg19] 16p12.2(21,576,802-21,841,354)x3	264,552	<i>METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>
ID_361	16y	HD	M	ID, epilepsy	arr[hg19] 16p12.2(21,576,802-21,852,932)x1	276,130	<i>METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>
ID_563	8y	HD	F	ID	arr[hg19] 16p12.2(21,596,299-21,817,922)x1	221,623	<i>METTL9, IGSF6, OTOA, RRN3P1</i>
ID_586	2y	2.7	F	GDD	arr[hg19] 17q11.1q11.2(25,332,931-26,084,641)x3	751,710	<i>WSB1, LOC440419, KSR1, LGALS9, NOS2</i>

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_379 (2)	2y	HD	F	GDD (mild)	arr[hg19] 11q22.3(104,804,278-105,112,236)x1, 18p11.31p11.23(6,929,190-8,087,455)x3	1,158,265	<i>LOC400643, LAMA1, LRRC30, PTPRM</i>
ID_311	8y	HD	M	ID, ASD, macrosomia	arr[hg19] 18p11.22(9,162,250-9,532,196)x3 no pat	369,946	<i>ANKRD12, TWSG1, RALBP1</i>
ID_549	7y	HD	M	ID	arr[hg19] 18p11.22p11.21(10,585,537-11,594,922)x1	1,009,385	<i>FAM38B</i>
ID_263	6y	HD	F	ID, epilepsy, hypotonia, pes planus	arr[hg19] 18p11.21(10,913,276-11,610,479)x1	697,203	<i>FAM38B</i>
ID_524	10y	2.7	M	ID	arr[hg19] 18p11.21(12,915,693-13,183,822)x3	268,129	<i>SEH1L, CEP192</i>
ID_83	14y	HD	F	ID, obesity, pubertal delay	arr[hg19] 18p11.21(12,918,250-13,183,317)x3	265,067	<i>SEH1L, CEP192</i>
ID_18	1y	2.7	F	GDD, facial dysmorphic features	arr[hg19] 18q12.2(33,751,258-34,813,138)x3	1,061,880	<i>ELP2, MOCOS, FHOD3, C18orf10, KIAA1328</i>
ID_249	4y	HD	M	ID	arr[hg19] 18q22.1(64,809,285-65,219,867)x3	410,582	<i>DSEL, LOC643542</i>
ID_84 (4)	4y	HD	F	ID	arr[hg19] 2p24.3(14,398,051-14,505,127)x1, 19p13.3(6,246,138-6,822,631)x3	576,493	21 genes (<i>TUBB4, C3</i>)
ID_598	1y	2.7	F	GDD	arr[hg19] 19q13.43(56,576,293-57,656,254)x3	1,079,961	22 genes
ID_301	13y	HD	M	ID	arr[hg19] 22q13.31(44,470,955-46,459,591)x3	1,988,636	23 genes (<i>UPK3A, FBLN1, ATXN10</i>)
ID_553	9y	2.7	M	ID	arr[hg19] Xp22.33(567,182-1,401,735)x2	834,553	<i>SHOX, CRLF2, CSF2RA</i>
ID_128	4y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] Xp22.31(6,449,752-6,797,539)x0	347,787	<i>VCX3A</i>
ID_568	4y	2.7	M	ID	arr[hg19] Xp21.1p11.4(37,390,438-38,106,153)x2	715,715	<i>LANCL3, XK, CYBB, DYNLT3, CXorf27, SYTL5, SRPX</i>
ID_569	3y	HD	F	GDD	arr[hg19] Xq21.2(85,290,727-85,766,605)x3	475,878	<i>CHM, DACH2</i>
ID_32 (2)	2y	HD	F	GDD	arr[hg19] Xq21.2q21.31(85,632,742-86,633,326)x3, 6q23.2q23.3(135,086,901-136,136,872)x1	1,000,584	<i>DACH2</i>
ID_157 (2)	5y	HD	F	ID, psychomotor and language delay, visuospatial deficits	arr[hg19] Xq23(111,626,803-112,087,404)x3, 9q21.32q21.33(86,844,451-87,089,584)x3	460,601	<i>ZCCHC16, LHFPL1, AMOT, MIR4329</i>
ID_594	10y	2.7	M	ID, facial dysmorphic features, septo-optic dysplasia	arr[hg19] Xq23(112,258,945-112,927,623)x2	668,678	<i>LOC101928437, XACT</i>
ID_470	6y	HD	F	ID	arr[hg19] Xq23(112,258,945-112,940,342)x3	681,397	<i>LOC101928437, XACT</i>
ID_268	7y	HD	M	ID, ASD	arr[hg19] Xq24(118,773,162-119,252,281)x2	479,119	13 genes (<i>UPF3B, NDUFA1</i>)

C: *Likely benign CNVs* (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_51	14y	HD	M	ID, growth retardation, microcephaly	arr[hg19] 2q11.1(95,341,516-95,811,549)x3	470,033	<i>ANKRD20B</i> , <i>TEKT4</i> , <i>MAL</i> , <i>MRPS5</i>
ID_267	7y	HD	M	ID	arr[hg19] 6q25.2q25.3(155,297,755-156,118,979)x3	821,224	<i>TIAM2</i> , <i>TFB1M</i> , <i>CLDN20</i> , <i>NOX3</i>
ID_21	6y	HD	M	ID	arr[hg19] 10q26.11(120,606,804-120,973,292)x3	366,488	<i>NANOS1</i> , <i>EIF3A</i> , <i>SNORA19</i> , <i>FAM45A</i> , <i>FAM45B</i> , <i>SFXN4</i> , <i>PRDX3</i> , <i>GRK5</i>
ID_379 (2)	2y	HD	F	GDD (mild)	arr[hg19] 11q22.3(104,804,278-105,112,236)x1, 18p11.31p11.23(6,929,190-8,087,455)x3	307,958	<i>CASP4</i> , <i>CASP5</i> , <i>CASP1</i> , <i>CARD16</i> , <i>CARD17</i> , <i>CARD18</i>
ID_19	11y	2.7	M	ID, ADHD, congenital heart disease	arr[hg19] 12q24.11(109,538,689-109,886,051)x3	347,362	<i>UNG</i> , <i>ACACB</i> , <i>FOXP4</i> , <i>MYO1H</i>
ID_258	15y	HD	M	ID (mild)	arr[hg19] 15q21.2(52,307,136-52,419,284)x1	112,148	<i>MAPK6</i> , <i>BCL2L10</i> , <i>GNB5</i>
ID_241	3m	HD	M	GDD, facial dysmorphic features, microsomia, heart murmur	arr[hg19] 19q13.12(37,795,777-37,949,477)x3	153,700	<i>HKR1</i> , <i>ZNF527</i> , <i>ZNF569</i>
ID_54 (2)	6y	HD	M	ID, language delay, facial dysmorphic features	arr[hg19] 8q13.2(68,646,303-69,221,734)x3, 19q13.31(44,360,203-44,520,095)x1	159,892	<i>ZNF404</i> , <i>ZNF45</i> , <i>ZNF221</i> , <i>ZNF155</i> , <i>ZNF230</i>
ID_510	9y	HD	F	ID	arr[hg19] 21q22.2(41,018,249-41,278,694)x3	260,445	<i>B3GALT5</i> , <i>IGSF5</i> , <i>PCP4</i>

(*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). (2) Patient with an additional variant of unknown clinical significance ((shown in grey). (3) Patient with an additional clinically relevant CNV and a benign CNV (both shown in grey). (4) Patient with an additional benign CNV (shown in grey). **Abbreviations:** y:years; m: months; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: Cytogenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ASD: autism spectrum disorder; GDD: global developmental delay; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; P2: patient 2; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table V: Benign CNVs sorted by chromosome.

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_617	10y	2.7	F	ID	arr[hg19] 1p31.1(83,284,445-83,645,233)x3	360,788	<i>LINC01361</i>
ID_619	11y	2.7	M	ID, short stature	arr[hg19] 1q41(218,006,349-218,201,463)x3	195,114	<i>SPATA17</i>
ID_218	12y	HD	M	ID (mild), ASD	arr[hg19] 1q42.13(227,559,977-227,787,807)x3	227,830	<i>ZNF678</i>
ID_499	9y	HD	F	ID, ASD	arr[hg19] 2p25.2(4,538,997-4,839,354)x3	300,357	<i>LOC727982</i>
ID_84 (1)	4y	HD	F	ID	arr[hg19] 2p24.3(14,398,051-14,505,127)x1, 19p13.3(6,246,138-6,822,631)x3	107,076	<i>LINC00276</i>
ID_416	8y	HD	F	ID (mild-moderate), ADHD, bilateral epicanthus, joint hypermobility	arr[hg19] 2q22.1(137,848,420-138,191,511)x1	343,091	<i>THSD7B</i>
ID_408	2y	HD	F	GDD	arr[hg19] 2q22.1(140,931,411-141,442,341)x3	510,930	<i>LRP1B</i>
ID_325 (2)	15y	HD	M	ID, short stature	arr[hg19] 3p22.3p22.3(34,900,399-35,543,442)x1 pat, 3q26.31(175,418,935-175,677,422)x3 mat, 15q13.2q13.3(30,370,017-32,444,261)x3 pat	643,043	<i>LOC101928135</i>
ID_123 (3)	10y	HD	M	ID, ADHD, macrosomia	arr[hg19] 4p15.33(11,870,242-12,230,025)x1 no mat, 7q11.23(72,718,277-74,142,215)x3 no mat	359,783	<i>LOC101929019</i>
ID_141	17y	HD	M	ID (moderate), epilepsy, ADHD, hypotonia, laryngomalacia, scoliosis	arr[hg19] 4p15.33(11,879,106-12,230,025)x1	350,919	<i>LOC101929019</i>
ID_28 (3)	13y	HD	F	ID, language delay	arr[hg19] 4q33(170,610,585-170,833,785)x3 mat, 16p11.2(29,567,295-30,177,916)x1 dn	223,200	<i>CLCN3, C4orf27</i>
ID_44	12y	HD	M	ID, partial agenesis of the corpus callosum, subependymal heterotopias	arr[hg19] 5p15.33(2,908,532-3,322,076)x3	413,544	<i>LINC01377</i>
ID_99	17y	HD	M	ID, neurofibromatosis, cerebellar hypoplasia	arr[hg19] 5q31.3(142,146,542-142,364,941)x3	218,399	<i>ARHGAP26</i>
ID_138	12y	HD	F	ID, multicystic kidney	arr[hg19] 6p24.3(8,594,604-8,718,988)x1	124,384	<i>HULC</i>
ID_217	14y	HD	F	ID, epilepsy, ADHD, short stature	arr[hg19] 6q22.31(119,755,623-120,226,902)x1	471,279	<i>LOC285762</i>
ID_371	7y	HD	M	ID (mild), ADHD	arr[hg19] 6q25.1(149,221,360-149,636,966)x3	415,606	<i>UST</i>

Sample	Age (*)	Array	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ID_130	1y	HD	F	GDD, hypotonia	arr[hg19] 7q22.1(103,295,580-103,397,082)x1	101,502	RELN (***)
ID_599	2y	2.7	M	GDD	arr[hg19] 8p22(15,545,640-15,893,002)x1 mat	347,362	TUSC3 (****)
ID_420	14y	HD	M	ID (mild), ADHD, epilepsy	arr[hg19] 11p14.3(22,107,533-22,274,309)x3	166,776	ANOS
ID_153	4y	HD	F	ID, ASD, facial dysmorphic features	arr[hg19] 12q24.32(127,812,509-128,901,875)x3	1,089,366	<i>FLJ37505</i> , <i>TMEM132C</i>
ID_163	4y	HD	M	ID, epilepsy, microcephaly, facial dysmorphic features	arr[hg19] 13q14.3(54,477,258-55,151,647)x3	674,389	<i>MIR1297</i>
ID_456	7y	HD	F	ID, ASD, congenital heart disease	arr[hg19] 13q22.3(77,782,493-78,073,267)x3	290,774	<i>MYCBP2</i>
ID_369	4y	HD	M	ID, facial dysmorphic features	arr[hg19] 15q11.2(23,620,191-23,789,856)x1	169,665	<i>GOLGA6L2</i>
ID_25	4y	HD	F	ID	arr[hg19] 16p13.2(9,225,951-9,431,175)x3	205,224	<i>MIR548X</i>
ID_400	14y	HD	M	ID (moderate)	arr[hg19] 16q23.2(80,502,185-80,760,588)x1	258,403	<i>DYNLRB2</i> , <i>CDYL2</i>
ID_70	NA	HD	M	ID, microcephaly	arr[hg19] 17p12(15,718,527-15,825,583)x1	107,056	<i>LOC101928567</i>

(*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (***) *RELN* (*reelin*; OMIM 600514) encodes a large glycoprotein with important roles in neuronal migration and positioning in the developing brain. This gene is reported to segregate in an autosomal recessive manner, with homozygous mutations causing lissencephaly (OMIM 257320), accompanied by developmental delay and epilepsy. Although with inconsistent results, *RELN* has been frequently analyzed by association studies in various disorders, especially schizophrenia and ASD (reviewed by (Folsom and Fatemi 2013; Lammert and Howell 2016) and recent whole exome/genome sequencing studies have detected *de novo* mutations in this gene in ASD patients (Neale et al. 2012; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Yuen et al. 2015). (****) Homozygous mutations in the *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*; OMIM 601385) gene, both SNVs and CNVs, have been reported in multiple consanguineous ID families (Garshasbi et al. 2008; Molinari et al. 2008; Garshasbi et al. 2011; Khan et al. 2011; Loddo et al. 2013; El Chehadeh et al. 2015; Al-Amri et al. 2016) and although we did not find additional deleterious mutations in the other allele (data not shown), we cannot exclude the presence of mutations in regulatory elements within the non-exonic sequence. (1) Patient with an additional variant of unknown clinical significance (shown in grey). (2) Patient with an additional clinically relevant CNV and a variant of unknown clinical significance (both shown in grey). (3) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). **Abbreviations:** y:years; NA: not available; HD: CytoScan High Density Array; 2.7M: Cytogenetics 2.7M array; F: female; M: male; ID: intellectual disability; ASD: autism

spectrum disorder; GDD: global developmental delay; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table V references:

- Al-Amri A, Saegh AA, Al-Mamari W, El-Asrag ME, Ivorra JL, Cardno AG, Inglehearn CF, Clapcote SJ, Ali M. 2016. Homozygous single base deletion in TUSC3 causes intellectual disability with developmental delay in an Omani family. *Am J Med Genet A*.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**(7526): 209-215.
- El Chehadeh S, Bonnet C, Callier P, Beri M, Dupre T, Payet M, Ragon C, Mosca-Boidron AL, Marle N, Mugneret F et al. 2015. Homozygous Truncating Intragenic Duplication in TUSC3 Responsible for Rare Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability with No Clinical or Biochemical Metabolic Markers. *JIMD reports* **20**: 45-55.
- Folsom TD, Fatemi SH. 2013. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* **68**: 122-135.
- Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. 2008. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**(5): 1158-1164.
- Garshasbi M, Kahrizi K, Hosseini M, Nouri Vahid L, Falah M, Hemmati S, Hu H, Tzschach A, Ropers HH, Najmabadi H et al. 2011. A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet A* **155A**(8): 1976-1980.
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE et al. 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**(7526): 216-221.
- Khan MA, Rafiq MA, Noor A, Ali N, Ali G, Vincent JB, Ansar M. 2011. A novel deletion mutation in the TUSC3 gene in a consanguineous Pakistani family with autosomal recessive nonsyndromic intellectual disability. *BMC Med Genet* **12**: 56.
- Lammert DB, Howell BW. 2016. RELN Mutations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in cellular neuroscience* **10**: 84.
- Loddo S, Parisi V, Doccini V, Filippi T, Bernardini L, Brovedani P, Ricci F, Novelli A, Battaglia A. 2013. Homozygous deletion in TUSC3 causing syndromic intellectual disability: a new patient. *Am J Med Genet A* **161A**(8): 2084-2087.
- Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J, Edkins S, Futreal PA, Stratton MR, Turner G et al. 2008. Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**(5): 1150-1157.

Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V et al. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**(7397): 242-245.

Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y et al. 2015. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature medicine* **21**(2): 185-191.



REFERENCES

- Ahn JW, Bint S, Bergbaum A, Mann K, Hall RP, Ogilvie CM. 2013. Array CGH as a first line diagnostic test in place of karyotyping for postnatal referrals - results from four years' clinical application for over 8,700 patients. *Mol Cytogenet* **6**(1): 16.
- Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. 2010. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature protocols* **5**(9): 1564-1573.
- APA. 2000. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision*. American Psychiatric Association, Washington DC.
- . 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed*. American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- Athanasakis E, Licastro D, Faletra F, Fabretto A, Dipresa S, Vozzi D, Morgan A, d'Adamo AP, Pecile V, Biarnes X et al. 2014. Next generation sequencing in nonsyndromic intellectual disability: From a negative molecular karyotype to a possible causative mutation detection. *Am J Med Genet A* **164**(1): 170-176.
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwinska K, Wisniowiecka-Kowalnik B, Kedzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow N et al. 2013. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genet*.
- Bartnik M, Wisniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska B, Smyk M, Kedzior M, Sobocka K, Kutkowska-Kazmierczak A, Klapecki J, Szczaluba K, Castaneda J et al. 2014. The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children. *Developmental period medicine* **18**(3): 307-317.
- Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, Filippi T, Carey JC. 2013. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol* **17**(6): 589-599.
- Buyse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. 2009. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* **52**(6): 398-403.
- Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrao J, Jardim A, Mascarenhas A, Pinto M, Lavoura N, Pais C et al. 2015. Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* **8**: 103.
- Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BW, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, Friend KL, Baker C, Buono S, Vissers LE et al. 2014. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet* **46**(10): 1063-1071.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V et al. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* **43**(9): 838-846.
- Chen CP, Lin SP, Su YN, Chern SR, Su JW, Lee CC, Wang W. 2012. Partial trisomy 1q (1q42.13-->qter) and partial monosomy 6q (6q27-->qter) in a girl with single median maxillary central incisor, corpus callosum dysgenesis and developmental delay. *Genet Couns* **23**(4): 447-455.
- Choucair N, Ghoch JA, Corbani S, Cacciagli P, Mignon-Ravix C, Salem N, Jalkh N, El Sabbagh S, Fawaz A, Ibrahim T et al. 2015. Contribution of copy number variants (CNVs) to congenital,

- unexplained intellectual and developmental disabilities in Lebanese patients. *Mol Cytogenet* **8**: 26.
- D'Amours G, Langlois M, Mathonnet G, Fetni R, Nizard S, Srour M, Tihy F, Phillips MS, Michaud JL, Lemyre E. 2014. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC medical genomics* **7**: 70.
- de Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LE, Richmond T, Geoghegan J, O'Moore K, de Leeuw N, Shaw C, Brunner HG et al. 2013. Detection of clinically relevant copy number variants with whole-exome sequencing. *Hum Mutat* **34**(10): 1439-1448.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C et al. 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* **367**(20): 1921-1929.
- Deciphering Developmental Disorders S. 2015. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* **519**(7542): 223-228.
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A et al. 2014. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**(7509): 344-347.
- Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, Shafer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M et al. 2011. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet* **7**(11): e1002334.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS et al. 2012. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* **367**(14): 1321-1331.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C et al. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* **42**(3): 203-209.
- Hehir-Kwa JY, Egmont-Petersen M, Janssen IM, Smeets D, van Kessel AG, Veltman JA. 2007. Genome-wide copy number profiling on high-density bacterial artificial chromosomes, single-nucleotide polymorphisms, and oligonucleotide microarrays: a platform comparison based on statistical power analysis. *DNA Res* **14**(1): 1-11.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. 2013. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* **84**(5): 415-421.
- Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, de Vries BB, Ponting CP, Veltman JA. 2010. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *PLoS Comput Biol* **6**(4): e1000752.
- Helsmoortel C, Vandeweyer G, Ordoukhanian P, Van Nieuwerburgh F, Van der Aa N, Kooy RF. 2014. Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. *Clin Genet*.
- Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. 2011. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* **135**(3-4): 174-202.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. 2009. 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* **52**(4): 161-169.

- Hu H, Haas SA, Chelly J, Van Esch H, Raynaud M, de Brouwer AP, Weinert S, Froyen G, Frints SG, Laumonnier F et al. 2015. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry*.
- Hu H, Wrogemann K, Kalscheuer V, Tzschach A, Richard H, Haas SA, Menzel C, Bienek M, Froyen G, Raynaud M et al. 2009a. Erratum to: Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* 3(1-4): 83.
- . 2009b. Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* 3(1-4): 41-49.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST et al. 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* 13(9): 777-784.
- Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN, Tolmacheva EN, Sazhenova EA, Magini P, Graziano C, Romeo G et al. 2014. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. *Gene* 536(1): 145-150.
- Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. 2010. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* 2(4): 182-209.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance C. 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 13(7): 680-685.
- Kirov G, Rees E, Walters JT, Escott-Price V, Georgieva L, Richards AL, Chambert KD, Davies G, Legge SE, Moran JL et al. 2013. The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay. *Biol Psychiatry*.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG et al. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* 30(3): 283-292.
- Leonard H, Wen X. 2002. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* 8(3): 117-134.
- Malhotra D, Sebat J. 2012. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148(6): 1223-1241.
- Menten B, Maas N, Thienpont B, Buysse K, Vandesompele J, Melotte C, de Ravel T, Van Vooren S, Balikova I, Backx L et al. 2006. Emerging patterns of cryptic chromosomal imbalance in patients with idiopathic mental retardation and multiple congenital anomalies: a new series of 140 patients and review of published reports. *J Med Genet* 43(8): 625-633.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* 86(5): 749-764.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P et al. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* 478(7367): 57-63.

- Niranjan TS, Skinner C, May M, Turner T, Rose R, Stevenson R, Schwartz CE, Wang T. 2015. Affected kindred analysis of human X chromosome exomes to identify novel X-linked intellectual disability genes. *PLoS One* **10**(2): e0116454.
- Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, Mullan G, Turner G, Einfeld S, Tonge B, Mowat D. 2013. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A*.
- Patel DR, Greydanus DE, Calles JL, Jr., Pratt HD. 2010. Developmental disabilities across the lifespan. *Disease-a-month : DM* **56**(6): 304-397.
- Peddibhotla S, Nagamani SC, Erez A, Hunter JV, Holder JL, Jr., Carlin ME, Bader PI, Perras HM, Allanson JE, Newman L et al. 2015. Delineation of candidate genes responsible for structural brain abnormalities in patients with terminal deletions of chromosome 6q27. *Eur J Hum Genet* **23**(1): 54-60.
- Perez-Gay L, Gomez-Lado C, Eiris-Punal J, Dacruz D, Quintela I, Barros-Angueira F, Castro-Gago M. 2013. [Microdeletion 2q23.1 and syndromic findings]. *Revista de neurologia* **57**(9): 430-431.
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z et al. 2014. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **94**(5): 677-694.
- Piton A, Redin C, Mandel JL. 2013. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. *Am J Hum Genet* **93**(2): 368-383.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* **38**(8): 904-909.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ et al. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* **81**(3): 559-575.
- Quintela I, Barros-Angueira F, Perez-Gay L, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris-Punal J. 2015a. [Deletion of the RPS6KA3 gene in a female with a classical phenotype of Coffin-Lowry syndrome including stimulus-induced drop attacks]. *Revista de neurologia* **61**(2): 94-96.
- Quintela I, Barros-Angueira F, Perez-Gay L, Dacruz D, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris-Punal J. 2015b. [Molecular characterisation and phenotypic description of two patients with reciprocal chromosomal aberrations in the region of the 3q29 microdeletion/microduplication syndromes]. *Revista de neurologia* **61**(6): 255-260.
- Quintela I, Barros F, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris J. 2015c. Clinical characterization of a male patient with the recently described 8q21.11 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* **167**(6): 1369-1373.
- Quintela I, Barros F, Fernandez-Prieto M, Martinez-Regueiro R, Castro-Gago M, Carracedo A, Gomez-Lado C, Eiris J. 2015d. Interstitial microdeletions including the chromosome band 4q13.2 and the UBA6 gene as possible causes of intellectual disability and behavior disorder. *Am J Med Genet A* **167**(12): 3113-3120.
- Quintela I, Barros F, Lago-Leston R, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris J. 2015e. A maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a de novo SOX5 deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features. *Am J Med Genet A* **167**(6): 1315-1322.

- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Huffmeier U, Thiel C, Ruschendorf F et al. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* **140**(19): 2063-2074.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donato N et al. 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **380**(9854): 1674-1682.
- Redin C, Gerard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S et al. 2014. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* **51**(11): 724-736.
- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. 2014. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* **535**(1): 70-78.
- Rodriguez-Revenga L, Vallespin E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, Garcia-Minaur S, Santos F, Mori MA, Lapunzina P, Mila M et al. 2013. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene* **521**(1): 82-86.
- Ropers HH. 2008. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* **18**(3): 241-250.
- . 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**: 161-187.
- Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. 2012. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med*.
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. 1992. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4913-4917.
- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. 2009. 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* **11**(3): 139-146.
- Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schroder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat EA, Lingen M et al. 2013. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet* **83**(1): 53-65.
- Spielmann M, Klopocki E. 2013. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Curr Opin Genet Dev* **23**(3): 249-256.
- Turner TN, Hormozdiari F, Duyzend MH, McClymont SA, Hook PW, Iossifov I, Raja A, Baker C, Hoekzema K, Stessman HA et al. 2016. Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA. *Am J Hum Genet* **98**(1): 58-74.
- Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Walker S, Wang Z, Hu P, Lamoureux S, Wei J, MacDonald JR, Pellecchia G, Lu C et al. 2015. A high-resolution copy-number variation resource for clinical and population genetics. *Genet Med* **17**(9): 747-752.
- Vergult S, Van Binsbergen E, Sante T, Nowak S, Vanakker O, Claes K, Poppe B, Van der Aa N, van Roosmalen MJ, Duran K et al. 2014. Mate pair sequencing for the detection of chromosomal aberrations in patients with intellectual disability and congenital malformations. *Eur J Hum Genet* **22**(5): 652-659.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Stehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M et al. 2010. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* **42**(12): 1109-1112.

- Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW, Schuurs-Hoeijmakers JH, Meader S, Hellebrekers CJ, Thoonen IJ, de Brouwer AP, Brunner HG, Webber C et al. 2013. Clinical Significance of De Novo and Inherited Copy-Number Variation. *Hum Mutat*.
- Wincent J, Anderlid BM, Lagerberg M, Nordenskjold M, Schoumans J. 2011. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. *Clin Genet* **79**(2): 147-157.
- Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, King DA, Ambridge K, Barrett DM, Bayzatinova T et al. 2015. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* **385**(9975): 1305-1314.
- Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE et al. 2010. Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases. *J Mol Diagn* **12**(2): 204-212.
- Zhou L, Chen C, Li H, Chen Y, Xu X, Lin X, Tang S. 2014. Delineation variable genotype/phenotype correlations of 6q27 terminal deletion derived from dic(6;18)(q27;p10). *Mol Cytogenet* **7**(1): 78.



SUPPLEMENTAL TABLES

Table S1: Chromosomal abnormalities (CNVs > 7.5 Mb; long runs of LOH and phenotypically recognizable syndromes) detected in our patients. **Abbreviations:** HD: CytoScan High Density array; 2.7M: Cytogenetics 2.7M array; M: male; F: female; ID: Intellectual Disability; S: sindromic; ter: terminal; PWS/AS: Prader-Willi Syndrome/Angelman Syndrome; LOH: Loss Of Heterozygosity; Mat: maternal; Chr: Chromosome; NA: Not available; hg19: human genome assembly 19; #: Number.





Table S1: Chromosomal abnormalities (CNVs > 7.5 Mb; long runs of LOH and phenotypically recognizable syndromes) detected in our patients.

Sample	Array	Gender	Phenotype	Chromosomal Abnormality / LOH Description	Inheritance	Type	Chr Cytoband Start -End (hg19)	Chr: start-end (hg19)	Size (bp)	# Genes
ID_86	HD	F	ID	Pelizaeus-Merzbacher disease	No mat	Gain	Xq21.32q23	X:92,652,108-115,751,359	23,099,251	132 genes
						Gain	Xq23q24	X:115,751,431-117,940,350	2,188,919	5 genes
ID_149	HD	M	ID	Whole 18p deletion	NA	Loss	18p11.32p11.21	18:136,226-15,157,836	15,021,610	Whole chr 18p
ID_175	HD	M	ID	7q11.23 microduplication syndrome	De novo	Gain	7q11.21q11.23	7:64,460,894-75,045,079	10,584,185	79 genes
ID_178	HD	M	ID	Klinefelter syndrome	NA	Gain	Whole chr X	Whole chr X	Whole chr X	Whole chr X
ID_257	HD	M	ID	23.2 Mb 5p15.32p14.1 deletion	De novo	Loss	5p15.32p14.1	5:4,698,836-27,989,797	23,290,961	49 genes
ID_291	HD	F	ID	10.8 Mb 8p23.1p21.3 deletion	NA	Loss	8p23.1p21.3	8:12,528,482-23,224,935	10,696,453	68 genes
ID_425	HD	M	ID (mild), obesity	XXY syndrome	NA	Gain	Whole chr Y	Whole chr Y	Whole chr Y	Whole chr Y
ID_478	2.7	F	ID	Jacobsen syndrome	NA	Loss	11q23.3q25	11:119,580,935-134,926,021	15,345,086	121 genes

Sample	Array	Gender	Phenotype	Chromosomal Abnormality / LOH Description	Inheritance	Type	Chr Cytoband Start -End (hg19)	Chr: start-end (hg19)	Size (bp)	# Genes
						Loss	7q35q36.3	7:144,075,623-159,119,707	15,044,084	102 genes
ID_479	HD	F	S-ID (profound)	7qter deletion + 20pter duplication	Mat. Balanced translocation	Gain	20p13p12.1	20:61,568-13,199,299	13,137,731	121 genes
						Gain	20p12.1p11.23	20:13,217,888-18,927,972	5,710,084	33 genes
ID_496	2.7	M	S-ID (severe)	1p32p31.1 deletion	NA	Loss	1p32.2p31.1	1:58,834,376-70,040,383	11,206,007	54 genes
ID_509	2.7	M	S-ID (severe)	Sotos Syndrome	NA	Loss	5q35.2q35.3	5:175,502,608-177,178,899	1,676,291	41 genes
ID_516	2.7	F	S-ID (severe)	7q33q35 deletion	NA	Loss	7q33q35	7:136,718,297-146,351,411	9,633,114	101 genes
ID_545	2.7	M	S-ID (severe)	PWS/AS region LOH	NA	LOH	15q11.2q14	15:22,300,190-38,453,356	16,153,166	171 genes
ID_564	2.7	F	S-ID (profound)	Whole chr 15 LOH	NA	LOH	Whole chr 15	Whole chr 15	Whole chr 15	Whole chr 15
						Gain	12p13.33p13.1	12:192,042-12,887,860	12,695,818	205 genes
ID_612	2.7	F	S-ID (severe)	12pter duplication + 18qter deletion	Mat. Balanced translocation	Loss	18q22.3q23	18:70,167,490-77,992,261	7,824,771	32 genes

SUPPLEMENTAL DATA

Patients with clinically relevant CNVs

Patient ID_45 arr 12p13.33(2,366,516-2,571,012)x1 (Figure S1)

Patient ID_45 is a 15-year-old male with a clinical diagnosis of mild syndromic intellectual disability (ID), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and behavior problems and a family clinical history of ID (a first degree relative with ID). Microarray-based copy number analysis revealed a heterozygous loss of 204.5 kb at chromosome 12p13.33, encompassing two exons of *CACNA1C* (MIM 114205) (Fig. S1), a gene that encodes the alpha-1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel. Mutations in this gene were reported to cause Brugada syndrome-3 (OMIM 611875) and Timothy syndrome (OMIM 114205). *CACNA1C* plays key roles in dendritic development, neuronal survival, synaptic plasticity, memory formation, learning and behavior [reviewed by (Bhat et al. 2012)] and specific common genetic variants in this gene have also been associated with psychiatric disorders, as bipolar disorder, depression, schizophrenia and autism spectrum disorders (ASDs) [[reviewed by (Bhat et al. 2012)] and (Lu et al. 2012; Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics and Genetic Risk Outcome of Psychosis 2013; Zheng et al. 2014)]. Clinical reports of patients with neurodevelopmental and behavior disorders and subtelomeric deletions at chromosome 12p, either terminal or interstitial, harboring or with their breakpoints disrupting the *CACNA1C* gene have also been published (Velinov et al. 2008; Rooryck et al. 2009; Macdonald et al. 2010; Abdelmoity et al. 2011; Madrigal et al. 2012; Vargas et al. 2012; Thevenon et al. 2013; Fanizza et al. 2014). The majority of these chromosomal aberrations affects several megabases of DNA sequence and harbors additional genes, making the establishment of genotype-phenotype correlations a challenging task. Our patient, however, presents an intragenic deletion of 204.5 kb exclusively affecting the *CACNA1C* gene (Fig. S1) and no additional rare exonic CNV was detected in his genome. In addition, no *CACNA1C* copy number loss was identified in our control samples (n=894). Also strikingly, Roberts et al. [2014] have recently reported a *de novo* 276 kb monogenic copy number gain in this gene, identified in a 9-year-old male with learning disabilities (Roberts et al. 2014). It is also important to note that none of the individuals with *CACNA1C* deletions described so far, including our patient, presented characteristics of Brugada syndrome or Timothy Syndrome, with the exception of the patient reported by Rooryck et al. [2009]. Thereby, as it was previously suggested in the literature (Abdelmoity et al. 2011; Vargas et al. 2012; Fanizza et al. 2014), copy number variants in this gene seem to be associated with phenotypes other than those reported for single nucleotide variants (SNVs). Overall, our findings along with literature review seem to support the relevance of *CACNA1C* in neurodevelopmental and behavior phenotypes, specifically mild-ID and ADHD, when its dose is altered.

Patient ID_401 arr Xq25(122,128,253-122,309,029)x2,Xq25(122,312,033-122,593,583)x2 (Figure S2)

Patient ID_401 is a 6-year-old male with ID, learning and language delays, ADHD, dystonic posturing of hands and feet and bifid earlobe. He was found to carry a 281.5 kb copy number gain at chromosome Xq25, encompassing 14 exons of the *GRIA3* (glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3; OMIM 305915) gene (Fig. S2), a glutamate receptor abundantly expressed

in the brain. Ionotropic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors are important mediators in synaptic transmission and essential in processes implicated in learning and memory (Gecz et al. 1999). Different types of genetic variants disrupting this gene -such as SNVs (Wu et al. 2007; Philips et al. 2014) or structural variants, including translocations (Gecz et al. 1999), copy number losses (Wu et al. 2007) and gains (Jacquemont et al. 2006; Chiyonobu et al. 2007; Bonnet et al. 2009; Guilmatre et al. 2009; Philippe et al. 2013)- have been identified in patients with a syndromic phenotype of ID (OMIM 300699). It is an X-linked medical condition and, in consequence, probands are frequently males who have inherited the mutation from an unaffected mother, with a skewed X-chromosome inactivation (XCI) pattern (Jacquemont et al. 2006; Chiyonobu et al. 2007; Bonnet et al. 2012; Philippe et al. 2013); nevertheless, a proportion of individuals with *GRIA3* variants and neurodevelopmental phenotypes are females, both probands ((Gecz et al. 1999), DECIPHER 288269 and 291248) and milder affected mothers with a random XCI (Bonnet et al. 2009). Our patient ID_ 401 carried a complex chromosomal rearrangement, with the aforementioned CNV disrupting *GRIA3* and an additional non-exonic Xq25 copy number gain locating within a gene desert, upstream of *GRIA3* (Fig S2). In that sense, Bonnet et al. (2012) previously informed on a male patient with ID and epilepsy and a duplication mapping 874-kb upstream of this gene (Bonnet et al. 2012). Taking all of these findings reported in the literature into consideration, we suggest that the Xq25 rearrangement found in our patient is responsible for his phenotype.

Patients with likely pathogenic CNVs

Patient ID_295 arr 1q41(218,432,883-220,940,873)x1 mat (Figure S3)

Patient ID_295 is a 15-year-old male with a core phenotype characterized by mild ID and joint hypermobility. Chromosomal microarray analysis in the family revealed a maternally inherited copy number loss of 2.5 Mb, mapping at chromosome 1q41 and affecting multiple genes (*RRP15*, *TGFB2*, *LYPLAL1*, *SLC30A10*, *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2*, *MIR215*, *MIR194-1*, *RAB3GAP2*, *MIR664*, *SNORA36B*, *AURKAPS1*, *MARK1*, *C1orf115* and *MOSC2*) (Fig. S3). Lindsay et al. (2012) identified heterozygous loss-of-function mutations or deletions in the *TGFB2* (transforming growth factor, beta-2; OMIM 190220) gene in 8 families with thoracic aortic aneurysm and additional clinical manifestations (Lindsay et al. 2012), fitted into the so-called Loeys-Dietz syndrome, type 4 (OMIM 614816; (Boileau et al. 2012; Lindsay et al. 2012)). Two of their patients, with copy number losses of 6.5 Mb and 3.5 Mb of length, respectively, both overlapping with our patient's deletion (Fig.S3), also manifested mild developmental delay (Lindsay et al. 2012). More recently, Fontana et al. (2014) reported on a new female patient with 4 deletions in her genome, one of them partially overlapping with the 1q41 region deleted in our patient (Fig.S3), and a complex phenotype, including some of the clinical manifestations distinctive of the Loeys-Dietz syndrome, type 4. Furthermore, the patient suffered a mild developmental delay in early ages that became borderline ID at the age of 18 years, when the last IQ evaluation gave a result of 70 (Fontana et al. 2014). The minimum region of overlap among the deletions found in these 3 patients previously reported in the literature (Lindsay et al. 2012; Fontana et al. 2014) and the one identified in our patient has a size of 1.07 Mb and harbors 3 genes (*RRP15*, *TGFB2* and *LYPLAL1*). Although this finding allows us to limit the 1q41 region previously proposed as candidate for ID (Fontana et al. 2014), some other genes deleted in our patient deserve special attention. First, the *RAB3GAP2*

(RAB3 GTPase-activating protein, noncatalytic subunit; OMIM 609275) gene is implicated in autosomal recessive ID, as part of the Martsolf syndrome (OMIM 212720) and the Warburg micro syndrome 2 (OMIM 614225) and, second, the *MARK1* (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1) gene, which encodes a protein kinase implicated in the phosphorylation of microtubule-associated proteins, important for the regulation and establishment of cell polarity, cell cycle regulation, vesicular transport and cell migration (OMIM 606511), has also been suggested as an autism susceptibility gene (Maussion et al. 2008). Additionally, the MARK proteins have been shown to be relevant in the morphogenesis of dendritic spines in hippocampal neurons (Wu et al. 2012), whose activity is dependent on the NMDA subtype of glutamate receptors and is believed to be important for cognitive functions, such as learning and memory. Furthermore, Bernard and Zhang (2015) have recently shown that *MARK* is activated downstream of NMDA receptors in primary hippocampal neurons through a protein kinase A-dependent mechanism and suggested its implication in synaptic plasticity (Bernard and Zhang 2015).

Patient ID_210 arr 2q36.3(230,742,418-230,846,708)x1 (Figure S4)

Patient ID_210 is a 17-year-old male with mild ID, attention deficit and social and behavior problems, who carried a 104 kb deletion at 2q36.3, with breakpoints disrupting *TRIP12* and *FBXO36* (Fig. S4). The *TRIP12* (thyroid hormone receptor interactor 12; OMIM 604506) gene was found to be one of the multiple genes affected by a *de novo* 2q36.1q36.3 deletion in a patient with multiple renal cysts and severe ID (Doco-Fenzy et al. 2008) and a *de novo* 2q36.3q37.1 loss in an individual with ASD (Pinto et al. 2014) (Fig. S4). Copy number losses restricted to *TRIP12* and *FBXO36* have also been described; i. e., Patient DECIPHER 281305, with global developmental delay and cystic renal dysplasia and an ASD sample of the AGP collection; in this case, a 60 kb deletion involving the first exon of *TRIP12* (reported to be part of the promoter of the gene) and, also partially, the *FBXO36* gene was identified in a male with ASD and no language delay (Fig. S4). However, no deletions in *TRIP12* were found among 4,768 controls and 4,875 parents (Sanders et al. 2015), further supporting its role in neurodevelopmental phenotypes. Additionally, exome sequencing of 343 ASD families allowed the identification of a female patient with a *de novo* nonsense SNV in *TRIP12* (Iossifov et al. 2012). Also, O’Roak et al. (2014) found a total of 4 *de novo* events in this gene in an ASD cohort of 3,681 individuals and highlighted that these mutation carriers all had, apart from ASD, mild to moderate ID (O’Roak et al. 2014). The *TRIP12* gene shares sequence similarity with *UBE3A* (ubiquitin-protein ligase E3A; OMIM 601623), associated with Angelman syndrome (OMIM 105830), and encodes a protein with E3 ubiquitin-ligase activity implicated, along with the X-linked ID gene *HUWE1*, in degradation of ubiquitin fusion substrates; in addition, *TRIP12* could be relevant in the regulation of DNA repair (Gudjonsson et al. 2012; Poulsen et al. 2012). A homozygous mutation in *Trip12* that alters its ubiquitin ligase activity resulted in embryonic lethality, suggesting a potential role for this gene in mouse embryogenesis (Kajiro et al. 2011). Although more studies and data are needed to finally confirm the pathogenicity of the 2q36.3 CNV identified in our sample, the fact that *de novo* loss-of-function *TRIP12* mutations and deletions were detected in multiple patients with neurodevelopmental disorders, the function of the protein and the aforementioned functional evidences, together with our own data, make *TRIP12* a strong potential candidate gene.

Patient ID_237 arr 4q31.23(148,694,448-149,325,972)x1 (Figure S5)

Patient ID_237 is a 17-year-old male with ID and facial dysmorphic features and a 631 kb copy number loss at chromosome 4q31.23, partially involving two genes: *ARHGAP10* and *NR3C2* (Fig. S5). The *NR3C2* (nuclear receptor subfamily 3, group c, member 2; OMIM 600983) gene encodes a mineralocorticoid receptor that functions as a ligand-dependent transcription factor that mediates the effects of aldosterone on different tissues, including the central nervous system (Zennaro et al. 2001). This gene has been widely studied in several psychiatric disorders; thus, its expression was found to be decreased in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and bipolar disorder (Xing et al. 2004) and it was suggested as a candidate predictor gene for response to risperidone in an integrated analysis combining: (1) a genome-wide SNP pharmacogenetic study to assess the response to risperidone treatment in schizophrenic individuals and (2) a global transcriptome analysis of the prefrontal cortex of risperidone-exposed mice (Ikeda et al. 2010). Additionally, *de novo* SNVs in *NR3C2* have been identified in patients with ASD (Iossifov et al. 2012; De Rubeis et al. 2014); and, recently, Turner et al. (2016) found an enrichment, with nominal significance, for *de novo* SNVs and CNVs in putative regulatory elements mapping near genes previously associated with autism risk, including *NR3C2*, in patients with ASD compared to controls (Turner et al. 2016). Finally, we found two ISCA patients with deletions disrupting the *NR3C2* gene: Patient nssv706299, with autism and a monogenic deletion partially affecting *NR3C2* and considered pathogenic and Patient nssv3396558, evaluated for developmental delay and/or other significant developmental or morphological phenotypes, who carried a likely pathogenic deletion also disrupting *ARHGAP10* and *NR3C2*, as the one identified in our patient (Fig. S5).

Patient ID_486 arr 11q22.3(10,8764,087-109,157,117)x3,19q13.32q13.33(47,678,453-48,404,515)x3 (Figure S6)

Patient ID_486 is a 9-year-old female with ID, ASD and visual deficit with congenital nystagmus, who harbored two CNVs in her genome: a partial duplication of the *DDX10* gene at 11q22.3 and an additional 19q13.32q13.33 copy number gain of 726 kb encompassing the following genes: *SAE1*, *BBC3*, *MIR3190*, *MIR3191*, *CCDC9*, *PRR24*, *C5AR1*, *GPR77*, *DHX34*, *MEIS3*, *SLC8A2*, *KPTN*, *NAPA*, *ZNF541*, *GLTSCR1*, *EHD2*, *GLTSCR2*, *SNORD23*, *SEPW1*, *TPRX1*, *CRX* y *SULT2A1* (Fig. S6). This second CNV was sub-classified as likely pathogenic due to the fact that: (1) deletions within this chromosomal region have been previously reported in intellectually disabled patients (Leal et al. 2009; Castillo et al. 2014), (2) it is gene-rich and (3) some of the genes involved were suggested as potential candidates for neurodevelopmental phenotypes. Thus, Leal et al. (2009) identified a *de novo* 19q13 deletion in a 28 year-old female with severe ID, tetralogy of Fallot, cleft lip and palate, facial asymmetry, scoliosis, deafness and megacolon (Leal et al. 2009). The shortest region of overlap between this CNV and the copy number gain found in our patient encompasses 14 genes (*SAE1*, *BBC3*, *MIR3190*, *MIR3191*, *CCDC9*, *PRR24*, *C5AR1*, *GPR77*, *DHX34*, *MEIS3*, *SLC8A2*, *KPTN*, *NAPA* y *ZNF541*), including some of those previously proposed by Leal et al. (2009) as candidate genes to explain some of the clinical features manifested by the patient; i.e., the *SAE1* (SUMO1-activating enzyme, subunit 1; OMIM 613294) gene, suggested as a candidate for cleft lip and palate; the *KPTN* (kaptin (actin binding protein); OMIM 615620) gene, proposed to explain congenital deafness; and *SLC8A2* (solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2; OMIM 601901), whose haploinsufficiency was potentially related to ID

and congenital abnormalities, specifically, cardiac defects and megacolon (Leal et al. 2009). Castillo et al. (2014) identified 3 additional patients with developmental delay and dysmorphic features carrying 4 microdeletions of different size, mapping at the chromosomal region duplicated in our sample ID_486 (Fig. S6). These authors defined a new 19q13.32 microdeletion syndrome and suggested that the phenotypic severity depends on the size and gene content of the CNV. In fact, Patient 1 and the patient reported by Leal et al. (2012), both with large *de novo* deletions, shared a recurrent syndromic phenotype, including ID, facial asymmetry, oculomotor paralysis, ptosis, cleft lip and palate, micrognathia, kyphoscoliosis and congenital cardiac and intestinal defects; however, their Patients 2 and 3 did not present most of the distinctive features, probably because they carried shorter deletions, not including the entire critical region for this syndrome. They also suggested that the haploinsufficiency of some of the genes deleted in their patients could explain their phenotypes; specifically, they highlighted *NPAS1*, *NAPA*, *ARHGAP35*, *SLC8A2*, *DHX34*, *MEIS3* and *ZNF541*, due to their expression in the brain parenchyma, glia, heart, gastrointestinal tract and musculoskeletal system (Castillo et al. 2014). Some of these genes, i. e. *NAPA*, *SLC8A2*, *DHX34*, *MEIS3* and *ZNF541*, and other candidates, i. e. *SAE1*, were duplicated in our sample ID_486, suggesting that not only the haploinsufficiency but also the gain of gene dosage may favor the occurrence of neurodevelopmental phenotypes. ISCA and DECIPHER databases also compiled brief clinical descriptions of two additional patients with copy number gains including within the CNV identified in our sample (Fig. S6); i. e., Patient DECIPHER 323363, a female with speech and language delays, prominent epicanthal folds and strabismus and a *de novo* copy number gain of unknown clinical impact and Patient nssv1602126, with autism and morphological abnormality of the central nervous system and a likely benign gain. Finally, the involvement of other genes located at 19q13.32q13.33, or even a potential contribution of the uncertain partial *DDX10* gain at chromosome 11q identified in our Patient ID_486, cannot be ruled out to explain her phenotype. Although more studies are needed to determine its significance, a 170 kb copy number loss involving this gene has been recently found in a patient with delay in motor milestones, motor stereotypy, absence of speech, ADHD, autistic signs, convergent strabismus, lateral nystagmus, hypermetropic astigmatism and facial dysmorphic features (Kashevarova et al. 2014). Furthermore, two DECIPHER patients presented copy number gains of the *DDX10* gene: Patient DECIPHER 306098, with autistic behavior and a likely pathogenic partial *DDX10* duplication and Patient DECIPHER 274910, with developmental delay and abnormality of higher intellectual function and a paternally inherited duplication of unknown pathogenicity, also involving *DDX10* and, partially, the *EXPH5* gene.

Patient ID_427 arr 20q12q13.11(40,946,119-42,040,938)x3 (Figure S7)

Patient ID_427 is a 4-year-old female diagnosed with moderate global developmental delay, who carried a 1.1 Mb copy number gain at 20q12q13.11 involving 11 out of the 32 exons of *PTPRT* (Fig. S7). The *PTPRT* (protein tyrosine phosphatase, receptor type; OMIM 608712) gene is one of the members of the type IIB receptor-type protein tyrosine phosphatase (RPTP) family, recently shown as a regulator of synaptic function and neuronal development through interactions with neuronal adhesion molecules and the dephosphorylation of synaptic molecules (Lee 2015). Interestingly, the *PTPRT* gene maps within a significant region for ASD, as reported in a genome-wide linkage analysis performed on a six-generation family with seven affected males (Allen-Brady et al. 2009). More recently, the combination of two

heterozygous variants within this gene (a *missense* SNV, c.4094C>T (p.Thr1365Met), and an intronic 150 kb deletion), detected by exome sequencing in a family with multiple affected members, was considered likely causal of a complex phenotype (severe ID, behavioral problems, microcephaly, congenital cardiac defect, and abdominal diaphragmatic hernia) (Schuurs-Hoeijmakers et al. 2013). Finally, mutation of a critical aspartate to alanine (D1046A), resulting in inactivation of the *PTPRT* catalytic domain, was found to significantly increase social interaction in male homozygous mutant mice compared to wild-type animals, while no significant changes were observed in their locomotor activities or anxiety-related behaviors (Thirtamara Rajamani et al. 2015). Although we conclude that more studies are needed to definitively establish the clinical relevance of the 20q12q13.11 gain identified in our patient ID_427, it is important to note that several duplications, also partially affecting the *PTPRT* gene and all included in our sample's CNV, were considered likely pathogenic for neurodevelopmental disorders in patient repositories; this is the case of Patient DECIPHER 289027, a female with global developmental delay and microcephaly and a copy number gain of unknown inheritance; Patient DECIPHER 290118, with facial dysmorphism, inappropriate behavior and an identical maternally inherited duplication; and Patient DECIPHER 288576, with ID and a copy number gain of unknown inheritance (Fig. S7).



SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_45 and literature review [hg19].

Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_401 [hg19].

Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_295 and literature review [hg19].

Figure S4. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_210 and literature review [hg19].

Figure S5. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_237 and ISCA patients [hg19].

Figure S6. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_486 and literature review [hg19].

Figure S7. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_427 and DECIPHER patients [hg19].

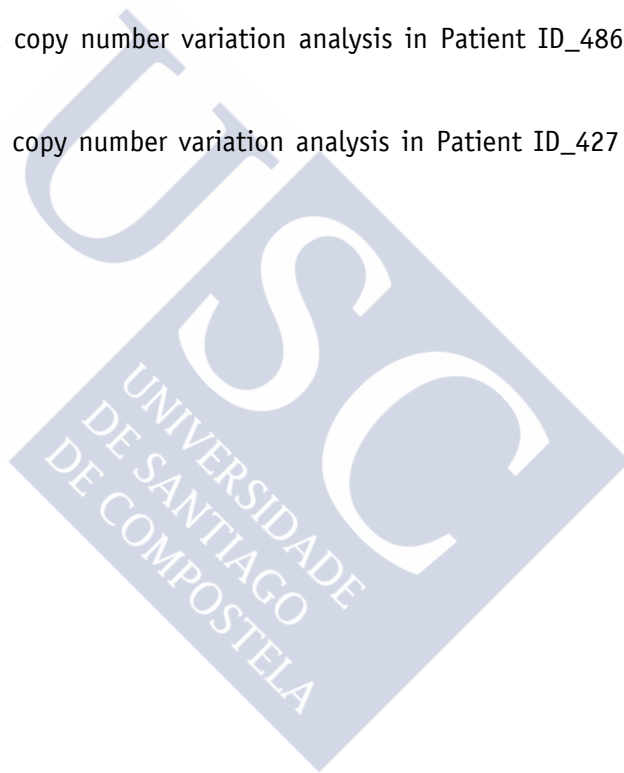




Figure S1. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_45 and literature review [hg19].

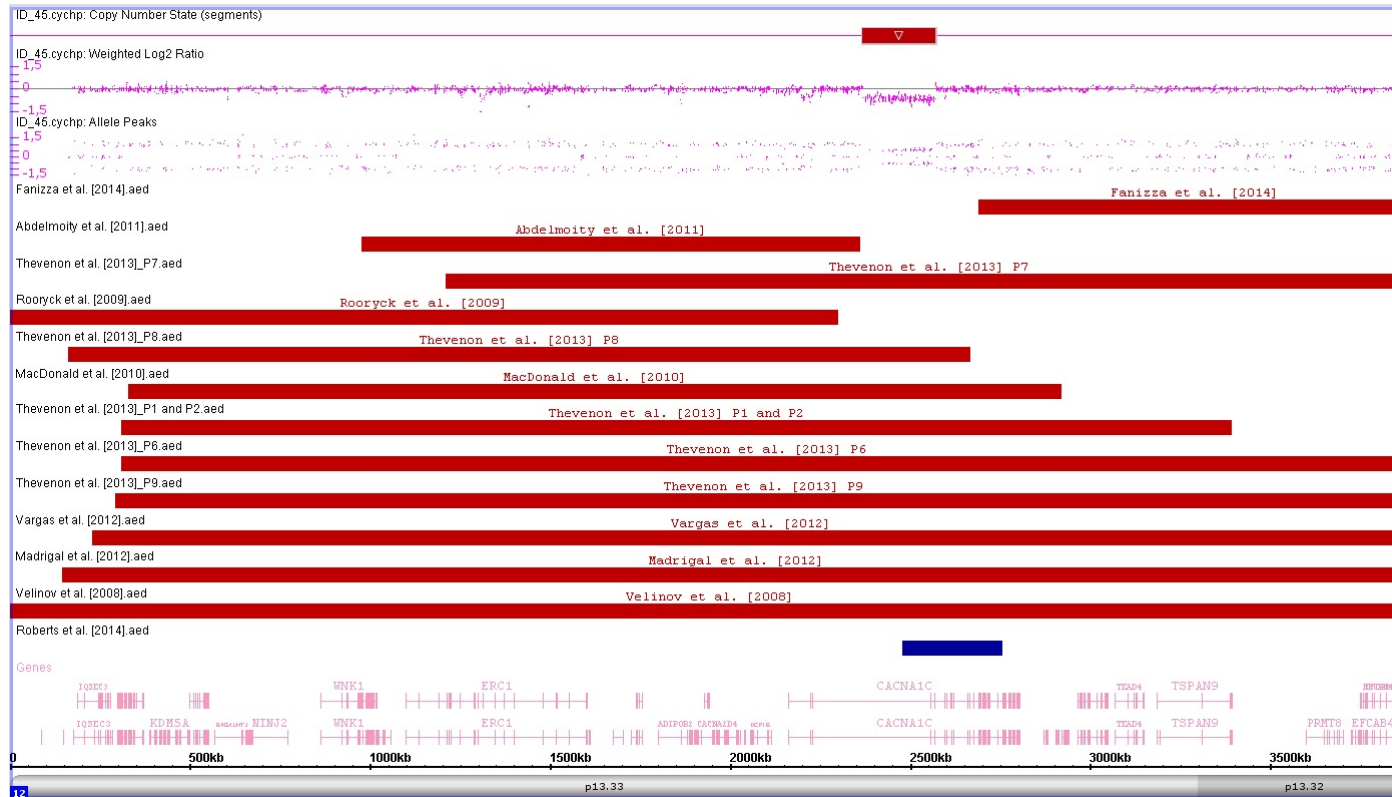


Figure S1. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-45, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 204.5 kb deletion at chromosome 12p13.33 [arr 12p13.33(2,366,516-2,571,012)x1 mat] identified in Patient ID-45 and scheme of previously reported 12p subtelomeric aberrations encompassing or with their breakpoints within the *CACNA1C* gene [Velinov et al., 2008; Rooryck et al., 2009; Macdonald et al., 2010; Abdelmoity et al. 2011; Madrigal et al., 2012; Vargas et al., 2012; Thevenon et al., 2013; Fanizza et al., 2014; Roberts et al., 2014]. The UCSC Genome LiftOver Tool was used for converting genome coordinates between hg18 and hg19 assemblies, where necessary.

Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_401 [hg19].

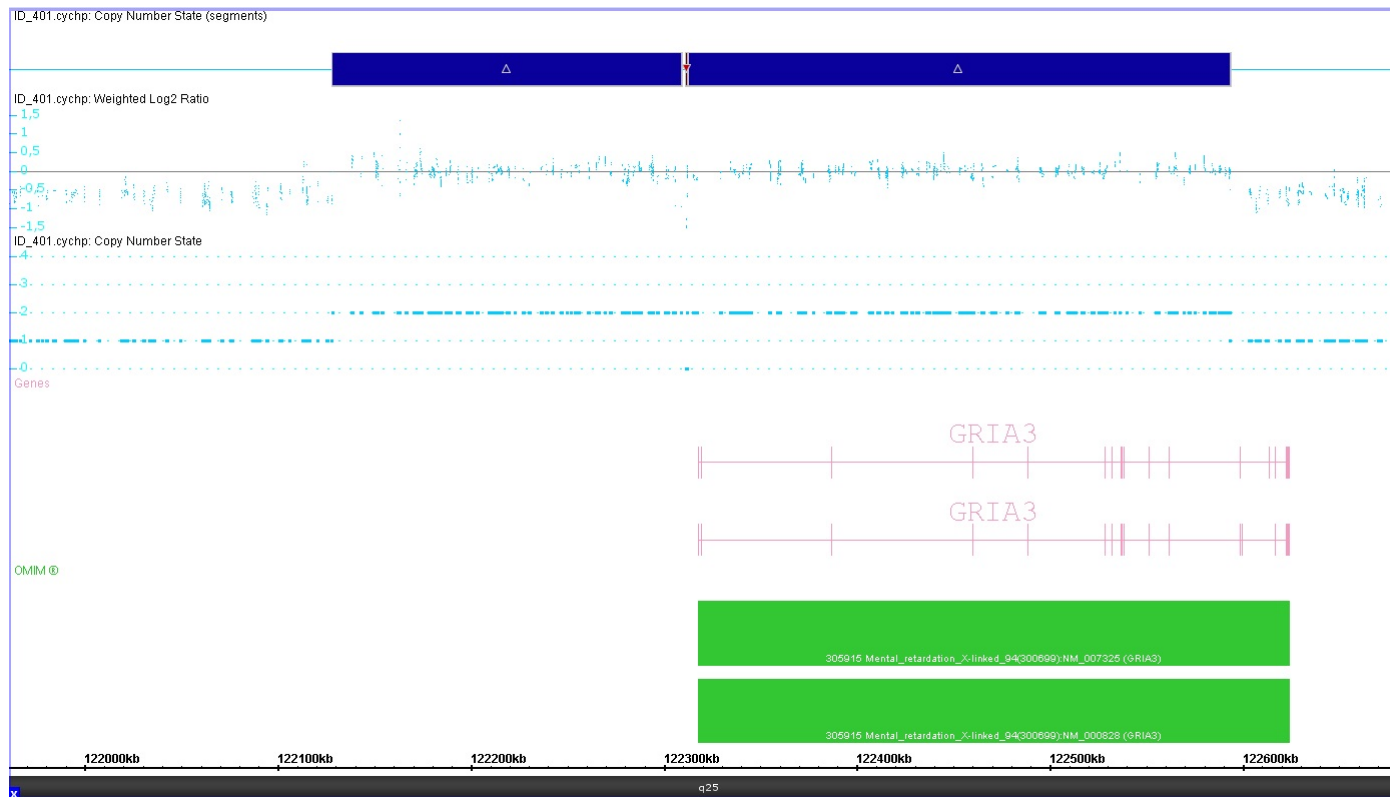


Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-401, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the Xq25 region showing the chromosomal rearrangement [arr Xq25(122,128,253-122,309,029)x2,Xq25(122,312,033-122,593,583)x2] identified in Patient ID_401.

Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_295 and literature review [hg19].

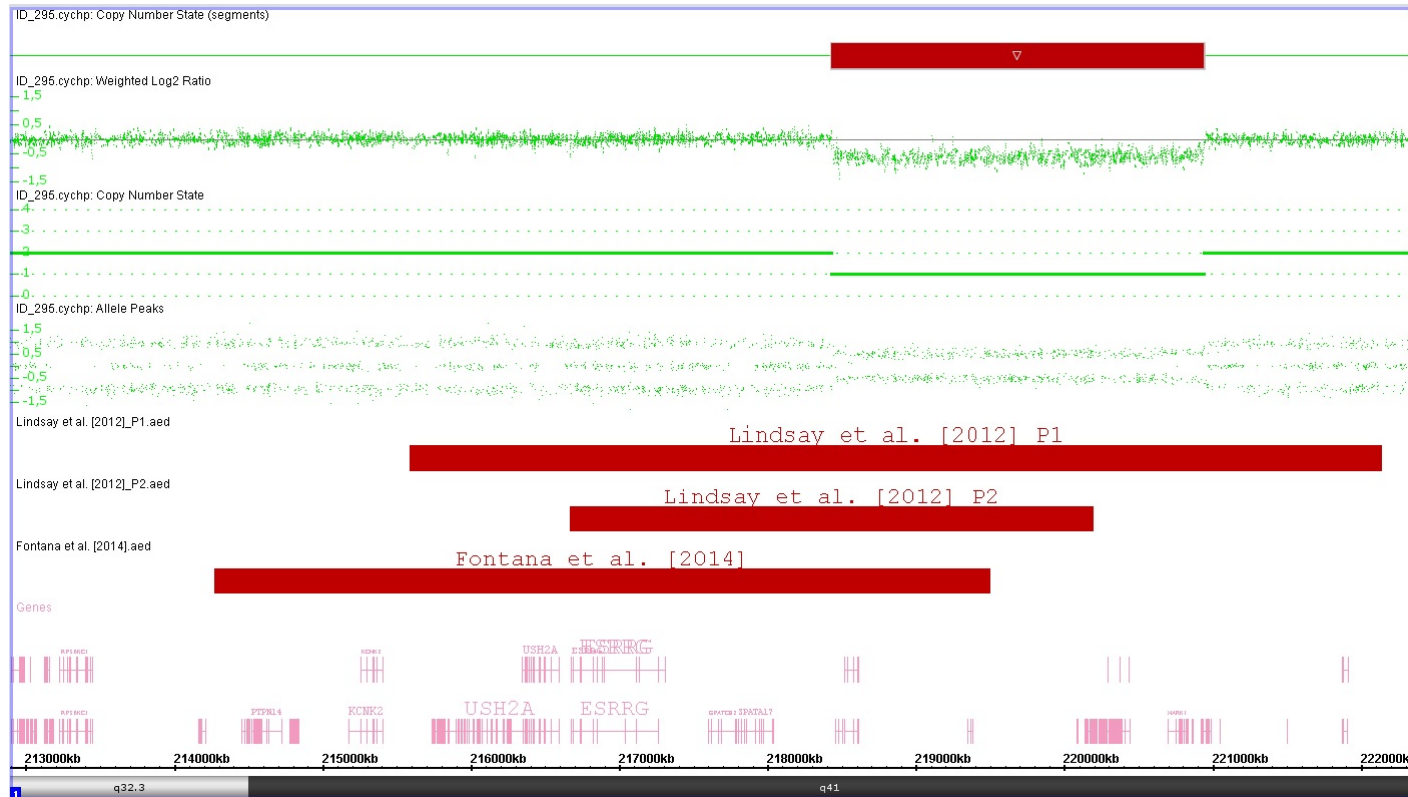


Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-295, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 1q41 copy number loss [arr 1q41(218,432,883-220,940,873)x1] identified in Patient ID_295 and scheme of partially overlapping deletions of patients reported by [Lindsay et al., 2012; Fontana et al., 2014]. The UCSC Genome LiftOver Tool was used for converting genome coordinates between hg18 and hg19 assemblies, where necessary. UCSC genes within the chromosomal region deleted in our patient, as plotted in the UCSC Genome Browser (hg19), are also shown in the lower panel.

Figure S4. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_210 and literature review [hg19].

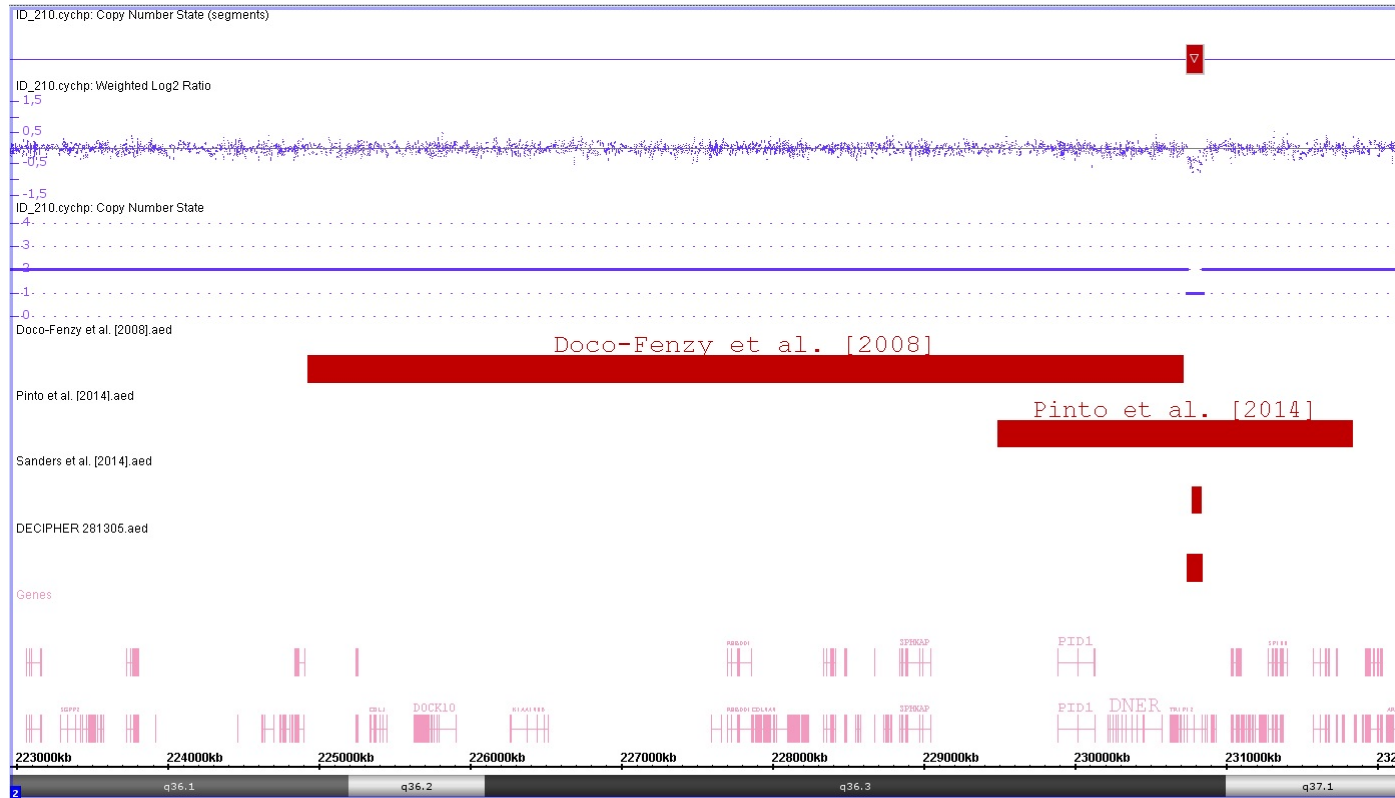


Figure S4. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-210, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 2q36.3 copy number loss identified [arr 2q36.3(230,742,418-230,846,708)x1] in Patient ID_210 and scheme of larger multigenic deletions including *TRIP12* [Doco-Fenzy et al., 2008; Pinto et al., 2014] and copy number losses restricted to *TRIP12* and *FBXO36* [Sanders et al., 2014; DECIPHER]. The UCSC Genome LiftOver Tool was used for converting genome coordinates from hg17 or hg18 assemblies to hg19, where necessary. UCSC genes within the chromosomal region deleted in our patient, as plotted in the UCSC Genome Browser (hg19), are also displayed in the lower panel.

Figure S5. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_237 and ISCA patients [hg19].

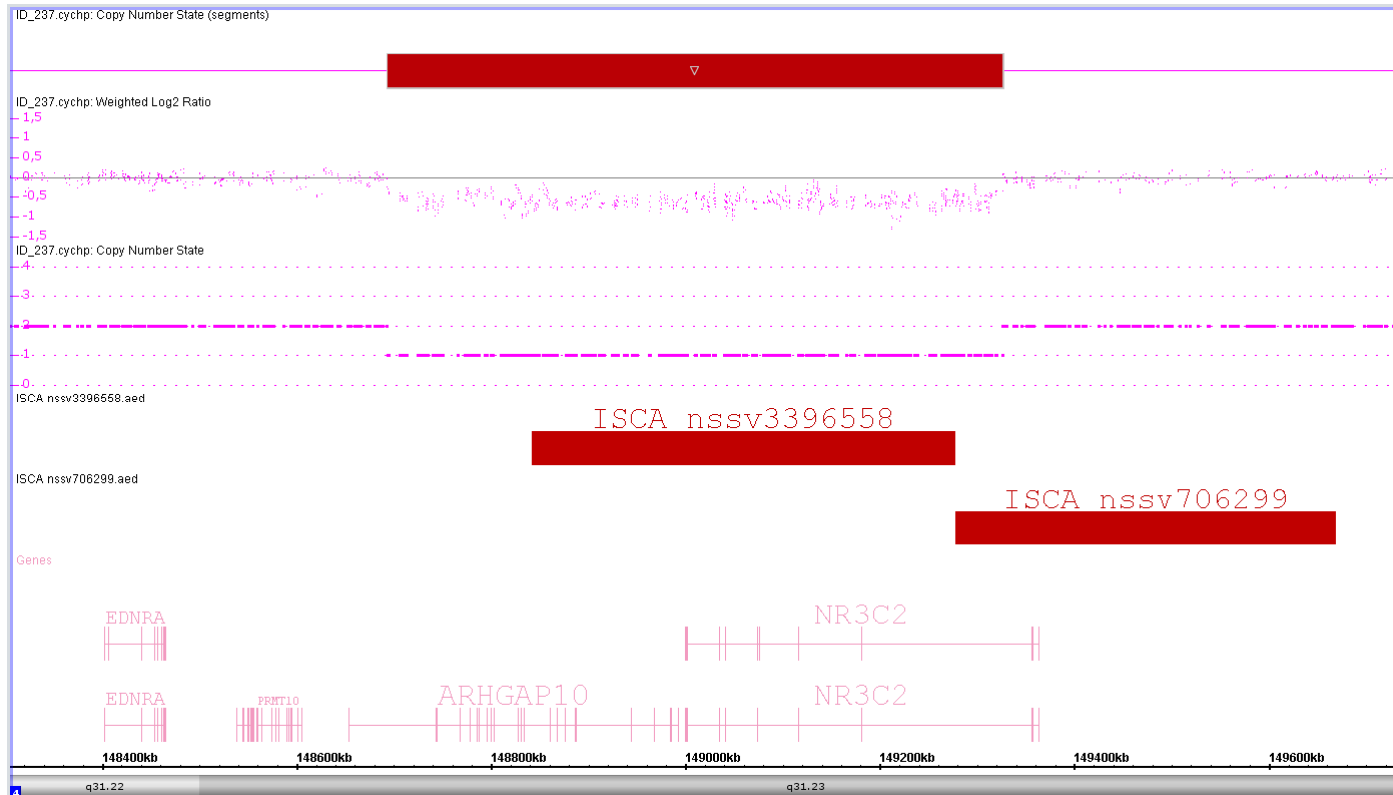


Figure S5. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-237, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 4q31.23 copy number loss [arr 4q31.23(148,694,448-149,325,972)x1] identified in Patient ID_237 and scheme of *NR3C2* microdeletions included in the ISCA database.

Figure S6. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_486 and literature review [hg19].

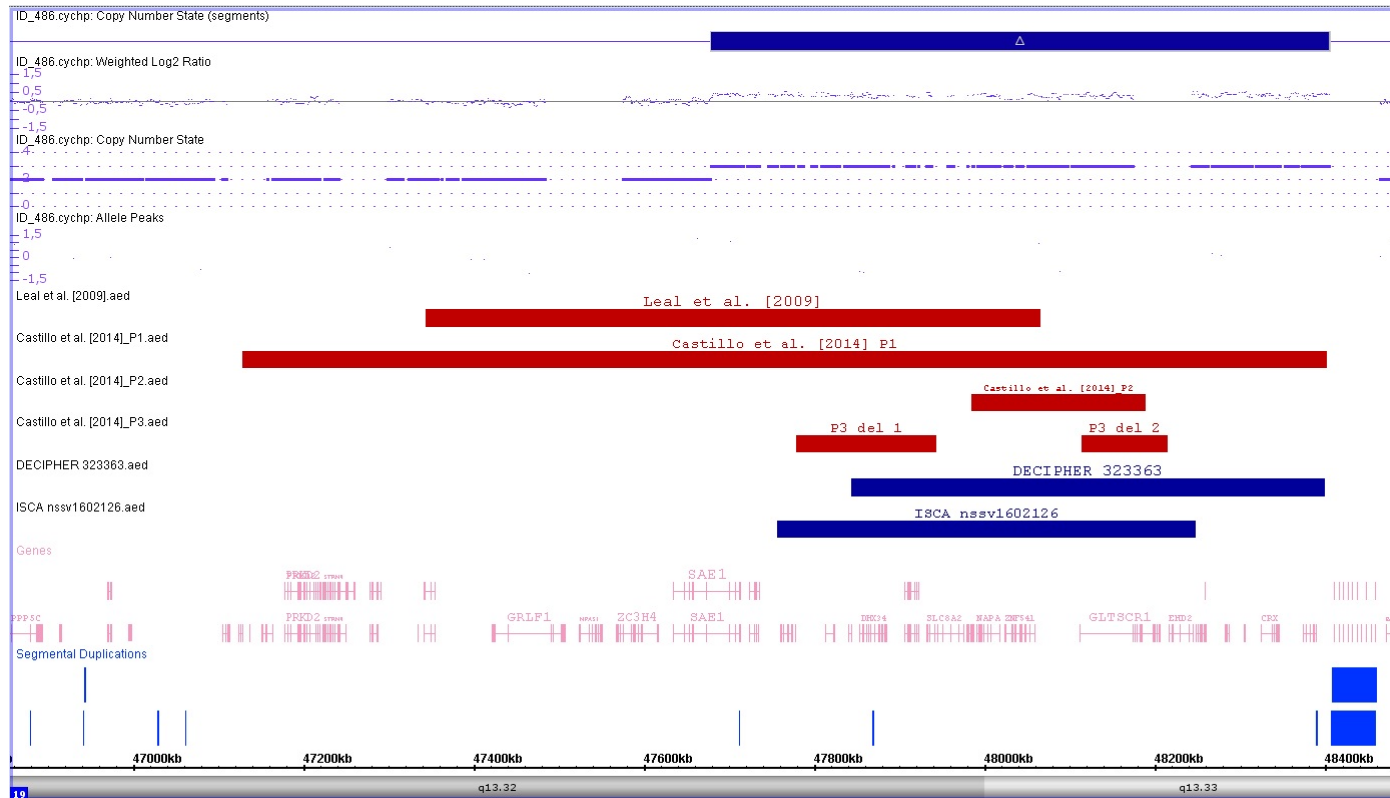


Figure S6. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-486, performed with the Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 19q13.32q13.33 copy number gain [arr 19q13.32q13.33(47,678,453-48,404,515)x3] identified in Patient ID_486 and scheme of partially overlapping microdeletions previously reported in the literature [Leal et al., 2009; Castillo et al., 2014] and copy number gains compiled in patient repositories [DECIPHER, ISCA]. The UCSC Genome LiftOver Tool was used for converting genome coordinates from hg17 or hg18 assemblies to hg19, where necessary. UCSC genes within the chromosomal region duplicated in our patient, as plotted in the UCSC Genome Browser (hg19), are displayed in the lower panel.

Figure S7. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID_427 and DECIPHER patients [hg19].

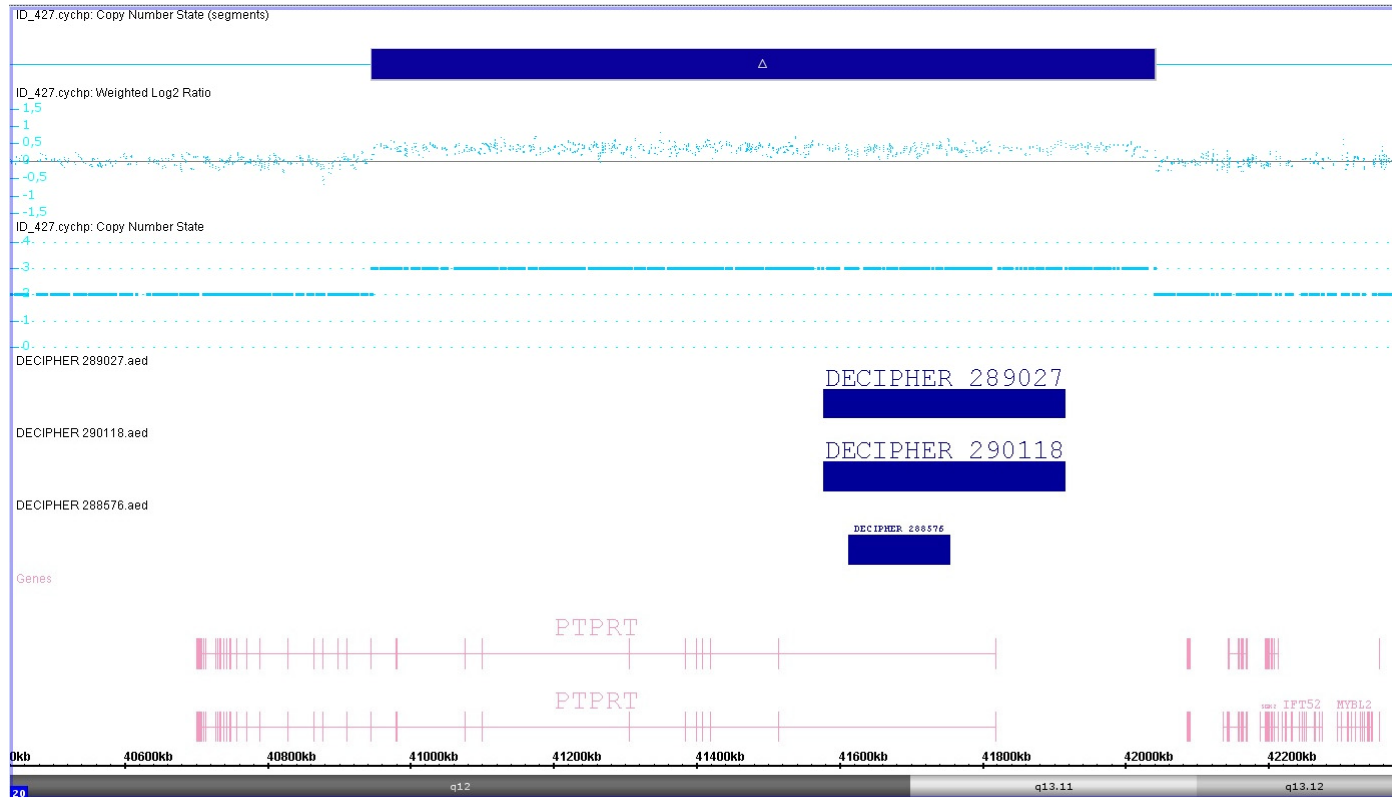


Figure S7. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ID-427, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 20q12q13.11 copy number gain [arr 20q12q13.11(40,946,119-42,040,938)x3] identified in Patient ID_486 and scheme of *PTPRT*-restricted gains found in DECIPHER's patients.



SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Abdelmoity AT, Hall JJ, Bittel DC, Yu S. 2011. 1.39 Mb inherited interstitial deletion in 12p13.33 associated with developmental delay. *Eur J Med Genet* **54**(2): 198-203.
- Allen-Brady K, Miller J, Matsunami N, Stevens J, Block H, Farley M, Krasny L, Pingree C, Lainhart J, Leppert M et al. 2009. A high-density SNP genome-wide linkage scan in a large autism extended pedigree. *Mol Psychiatry* **14**(6): 590-600.
- Bernard LP, Zhang H. 2015. MARK/Par1 Kinase Is Activated Downstream of NMDA Receptors through a PKA-Dependent Mechanism. *PLoS One* **10**(5): e0124816.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD. 2012. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol* **99**(1): 1-14.
- Boileau C, Guo DC, Hanna N, Regalado ES, Detaint D, Gong L, Varret M, Prakash SK, Li AH, d'Indy H et al. 2012. TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet* **44**(8): 916-921.
- Bonnet C, Leheup B, Beri M, Philippe C, Gregoire MJ, Jonveaux P. 2009. Aberrant GRIA3 transcripts with multi-exon duplications in a family with X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A* **149A**(6): 1280-1289.
- Bonnet C, Masurel-Paulet A, Khan AA, Beri-Dexheimer M, Callier P, Mugneret F, Philippe C, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Jonveaux P. 2012. Exploring the potential role of disease-causing mutation in a gene desert: duplication of noncoding elements 5' of GRIA3 is associated with GRIA3 silencing and X-linked intellectual disability. *Hum Mutat* **33**(2): 355-358.
- Castillo A, Kramer N, Schwartz CE, Miles JH, DuPont BR, Rosenfeld JA, Graham JM, Jr. 2014. 19q13.32 microdeletion syndrome: three new cases. *Eur J Med Genet* **57**(11-12): 654-658.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics C, Genetic Risk Outcome of Psychosis C. 2013. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* **381**(9875): 1371-1379.
- Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T et al. 2007. Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation. *Am J Med Genet A* **143A**(13): 1448-1455.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**(7526): 209-215.
- Doco-Fenzy M, Landais E, Andrieux J, Schneider A, Delemer B, Sulmont V, Melin JP, Ploton D, Thevenard J, Monboisse JC et al. 2008. Deletion 2q36.2q36.3 with multiple renal cysts and severe mental retardation. *Eur J Med Genet* **51**(6): 598-607.
- Fanizza I, Bertuzzo S, Beri S, Scalera E, Massagli A, Sali ME, Giorda R, Bonaglia MC. 2014. Genotype-phenotype relationship in a child with 2.3 Mb de novo interstitial 12p13.33-p13.32 deletion. *Eur J Med Genet* **57**(7): 334-338.
- Fontana P, Genesisio R, Casertano A, Cappuccio G, Mormile A, Nitsch L, Iolascon A, Andria G, Melis D. 2014. Loeys-Dietz syndrome type 4, caused by chromothripsis, involving the TGFB2 gene. *Gene* **538**(1): 69-73.
- Gecz J, Barnett S, Liu J, Hollway G, Donnelly A, Eyre H, Eshkevari HS, Baltazar R, Grunn A, Nagaraja R et al. 1999. Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* **62**(3): 356-368.
- Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, Toledo L, Dinant C, Grofte M, Bartkova J, Poulsen M, Oka Y, Bekker-Jensen S et al. 2012. TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* **150**(4): 697-709.

- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F et al. 2009. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of general psychiatry* **66**(9): 947-956.
- Ikedo M, Tomita Y, Mouri A, Koga M, Okochi T, Yoshimura R, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Hashimoto R, Williams HJ et al. 2010. Identification of novel candidate genes for treatment response to risperidone and susceptibility for schizophrenia: integrated analysis among pharmacogenomics, mouse expression, and genetic case-control association approaches. *Biol Psychiatry* **67**(3): 263-269.
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A et al. 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **74**(2): 285-299.
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC et al. 2006. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* **43**(11): 843-849.
- Kajiro M, Tsuchiya M, Kawabe Y, Furumai R, Iwasaki N, Hayashi Y, Katano M, Nakajima Y, Goto N, Watanabe T et al. 2011. The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PLoS One* **6**(10): e25871.
- Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN, Tolmacheva EN, Sazhenova EA, Magini P, Graziano C, Romeo G et al. 2014. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. *Gene* **536**(1): 145-150.
- Leal T, Andrieux J, Duban-Bedu B, Bouquillon S, Breviere GM, Delobel B. 2009. Array-CGH detection of a de novo 0.8Mb deletion in 19q13.32 associated with mental retardation, cardiac malformation, cleft lip and palate, hearing loss and multiple dysmorphic features. *Eur J Med Genet* **52**(1): 62-66.
- Lee JR. 2015. Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. *BMB reports* **48**(5): 249-255.
- Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJ, Fishman EK, Chen Y, Myers L et al. 2012. Loss-of-function mutations in TGF β 2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet* **44**(8): 922-927.
- Lu AT, Dai X, Martinez-Agosto JA, Cantor RM. 2012. Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Molecular autism* **3**(1): 18.
- Macdonald AH, Rodriguez L, Acena I, Martinez-Fernandez ML, Sanchez-Izquierdo D, Zuazo E, Martinez-Frias ML. 2010. Subtelomeric deletion of 12p: Description of a third case and review. *Am J Med Genet A* **152A**(6): 1561-1566.
- Madrigal I, Martinez M, Rodriguez-Revenga L, Carrio A, Mila M. 2012. 12p13 rearrangements: 6 Mb deletion responsible for ID/MCA and reciprocal duplication without clinical responsibility. *Am J Med Genet A* **158A**(5): 1071-1076.
- Maussion G, Carayol J, Lepagnol-Bestel AM, Tores F, Loe-Mie Y, Milbreta U, Rousseau F, Fontaine K, Renaud J, Moalic JM et al. 2008. Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism. *Hum Mol Genet* **17**(16): 2541-2551.
- O'Roak BJ, Stessman HA, Boyle EA, Witherspoon KT, Martin B, Lee C, Vives L, Baker C, Hiatt JB, Nickerson DA et al. 2014. Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nature communications* **5**: 5595.
- Philippe A, Malan V, Jacquemont ML, Boddaert N, Bonnefont JP, Odent S, Munnich A, Colleaux L, Cormier-Daire V. 2013. Xq25 duplications encompassing GRIA3 and STAG2 genes in two families convey recognizable X-linked intellectual disability with distinctive facial appearance. *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1370-1375.
- Philips AK, Siren A, Avela K, Somer M, Peippo M, Ahvenainen M, Doagu F, Arvio M, Kaariainen H, Van Esch H et al. 2014. X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability--four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J Rare Dis* **9**: 49.

- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z et al. 2014. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **94**(5): 677-694.
- Poulsen EG, Steinhauer C, Lees M, Lauridsen AM, Ellgaard L, Hartmann-Petersen R. 2012. HUWE1 and TRIP12 collaborate in degradation of ubiquitin-fusion proteins and misframed ubiquitin. *PLoS One* **7**(11): e50548.
- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. 2014. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* **535**(1): 70-78.
- Rooryck C, Stef M, Burgelin I, Simon D, Souakri N, Thambo JB, Chateil JF, Lacombe D, Arveiler B. 2009. 2.3 Mb terminal deletion in 12p13.33 associated with oculoauriculovertebral spectrum and evaluation of WNT5B as a candidate gene. *Eur J Med Genet* **52**(6): 446-449.
- Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* **87**(6): 1215-1233.
- Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de V, II, van Bon BW, de Ligt J, Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Neveling K, del Rosario M et al. 2013. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet* **50**(12): 802-811.
- Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, Minot D, Mosca Anne L, Marle N, Sanlaville D et al. 2013. 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with childhood apraxia of speech. *Eur J Hum Genet* **21**(1): 82-88.
- Thirtamara Rajamani K, O'Neill B, Han DD, Frosthalm A, Rotter A, Gu HH. 2015. Inactivation of the catalytic phosphatase domain of PTPRT/RPTPrho increases social interaction in mice. *Autism Res* **8**(1): 19-28.
- Turner TN, Hormozdiari F, Duyzend MH, McClymont SA, Hook PW, Iossifov I, Raja A, Baker C, Hoekzema K, Stessman HA et al. 2016. Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA. *Am J Hum Genet* **98**(1): 58-74.
- Vargas H, Beldia G, Korosh W, Sudhalter V, Iqbal A, Sanchez-Lacay JA, Velinov M. 2012. A 4.5 Mb terminal deletion of chromosome 12p helps further define a psychosis-associated locus. *Eur J Med Genet* **55**(10): 573-576.
- Velinov M, Beldia G, Gu H, Tsiouris JA, Jenkins EC, Brown WT. 2008. Psychotic manifestations in a patient with mental retardation and a 6.2 megabase deletion at the distal short arm of chromosome 12. *CNS Spectr* **13**(6): 515-519.
- Wu Q, DiBona VL, Bernard LP, Zhang H. 2012. The polarity protein partitioning-defective 1 (PAR-1) regulates dendritic spine morphogenesis through phosphorylating postsynaptic density protein 95 (PSD-95). *J Biol Chem* **287**(36): 30781-30788.
- Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, Suzuki E, Jiang Y, Zhang L, Rodriguez J et al. 2007. Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18163-18168.
- Xing GQ, Russell S, Webster MJ, Post RM. 2004. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **7**(2): 143-153.
- Zennaro MC, Souque A, Viengchareun S, Poisson E, Lombes M. 2001. A new human MR splice variant is a ligand-independent transactivator modulating corticosteroid action. *Molecular endocrinology* **15**(9): 1586-1598.
- Zheng F, Zhang Y, Xie W, Li W, Jin C, Mi W, Wang F, Ma W, Ma C, Yang Y et al. 2014. Further evidence for genetic association of CACNA1C and schizophrenia: new risk loci in a Han Chinese population and a meta-analysis. *Schizophr Res* **152**(1): 105-110.



ARTÍCULO II. Caracterización molecular y descripción fenotípica de dos casos con aberraciones cromosómicas recíprocas en la región de los síndromes de microdelección/microduplicación 3q29

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros-Angueira, Laura Pérez-Gay, David Dacruz, Manuel Castro-Gago, Ángel Carracedo, Jesús Eirís-Puñal.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Rev Neurol. 2015 Sep 16;61(6):255-60.

PMID

26350776.

RESUMEN

Introducción. Los síndromes de microdelección y microduplicación 3q29 se caracterizan por una marcada heterogeneidad fenotípica, y el retraso del desarrollo y la discapacidad intelectual de grado leve-moderado son las manifestaciones clínicas más frecuentes.

Casos clínicos. Dos pacientes con aberraciones cromosómicas recíprocas en la región 3q29. La paciente con la microdelección 3q29 presenta dificultades de aprendizaje, microcefalia límite, dismorfismo facial leve, déficit atencional e impulsividad, y rasgos ansiosos y obsesivos. El paciente con la microduplicación 3q29 recíproca presenta dificultades de aprendizaje, dismorfismo facial leve y un perfil conductual disruptivo no asociado previamente con esta duplicación.

Conclusión. Se comparan los fenotipos de estos pacientes y se revisa la bibliografía de pacientes pediátricos con microdelecciones y microduplicaciones 3q29.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=26350776>





ARTÍCULO III. Clinical characterization of a male patient with the recently described 8q21.11 microdeletion syndrome

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros, Manuel Castro-Gago, Ángel Carracedo, Jesús Eiris.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Am J Med Genet A. 2015 Jun;167(6):1369-73.

DOI

10.1002/ajmg.a.37038.

RESUMEN

The 8q21.11 microdeletion syndrome (OMIM # 614230) has been recently described and is primarily characterized by intellectual disability and facial dysmorphism. We describe here a male patient of 9 years 9 months of age with moderate intellectual disability and dysmorphic facial features. A high resolution copy number variation analysis, performed with the Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP array, allowed the identification of a heterozygous 7.069 Mb microdeletion at chromosome 8q21.11-q21.13. Clinical comparison of our patient with literature shows many similarities. However, the whole facial appearance of our patient, especially the elongated rather than rounded face and the absence of a wide nasal bridge and epicanthal folds, confers him a phenotype similar only to a subset, but not to the majority, of the hitherto described patients.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fajmg.a.37038>





ARTÍCULO IV. A Maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a *de novo* SOX5 deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros, Ramón Lago-Lestón, Manuel Castro-Gago, Ángel Carracedo, Jesús Eirís.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Am J Med Genet A. 2015 Jun;167(6):1315-22.

DOI

10.1002/ajmg.a.36909.

RESUMEN

We detail here the clinical description and the family genetic study of a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features and a combination of two rare genetic variants: a maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication and a *de novo* 12p12.1 deletion affecting *SOX5*. The 16p13.11 microduplication has been implicated in several neurodevelopmental and behavioral disorders and is characterized by variable expressivity and incomplete penetrance. The causes of this variation in phenotypic expression are not fully clear, representing a challenge in genetic diagnosis and counseling. However, several authors have proposed the two hit model as one of the underlying mechanisms for this phenotypic heterogeneity. Our data could also support this two-hit model in which the 16p13.11-p12.3 duplication might contribute to the phenotype, not only as a single event but also in association with the *SOX5* deletion. The *SOX5* gene plays important roles in various developmental processes and has been associated with several neurodevelopmental disorders, mainly intellectual disability, developmental delay and language and/or speech delay as well as with behavior problems and dysmorphic features. However, many of the physical features and behavioral manifestations as well as language deficiencies present in our patient are consistent with those previously reported for *SOX5* deletions. Patients carrying multiple genomic variants, as the one presented here, illustrate the difficulty in analyzing genotypes when the contribution of each variant results in overlapping phenotypes and/or, alternatively, in the modification of the clinical manifestations defined by the coexisting variant.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fajmg.a.36909>





ARTÍCULO V. Interstitial microdeletions including the chromosome band 4q13.2 and the *UBA6* gene as possible causes of intellectual disability and behavior disorder

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros, Montse Fernández-Prieto, Rocío Martínez-Regueiro, Manuel Castro-Gago, Ángel Carracedo, Carmen Gómez-Lado, Jesús Eirís.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Am J Med Genet A. 2015 Dec;167(12):3113-20.

DOI

10.1002/ajmg.a.37291.

RESUMEN

The few proximal 4q chromosomal aberrations identified in patients with neurodevelopmental phenotypes that have been published to date are variable in type, size and breakpoints and, therefore, encompass different chromosome bands and genes, making the establishment of genotype–phenotype correlations a challenging task. Here, microarray-based copy number analysis allowed us the detection of two novel and partially overlapping deletions in two unrelated families. In Family 1, a 4q13.1-q13.2 deletion of 3.84 Mb was identified in a mother with mild intellectual disability and in her two children, both with mild intellectual disability and attention deficit hyperactivity disorder. In Family 2, a de novo 4q13.2-q13.3 deletion of 6.81 Mb was detected in a female patient, born to unaffected parents, with a diagnosis of mild intellectual disability, behavioral disorder and facial dysmorphism. The shortest region of overlap between these two aberrations is located at chromosome 4q13.2 and includes 17 genes amongst of which we suggest *UBA6* (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6) as a strong candidate gene for these phenotypes.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fajmg.a.37291>





ARTÍCULO VI. Deleción en el gen *RPS6KA3* en una mujer con un fenotipo clásico del síndrome de Coffin-Lowry incluyendo episodios de caída inducidos por estímulo

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros-Angueira, Laura Pérez-Gay, Manuel Castro-Gago, Ángel Carracedo, Jesús Eiris-Puñal.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Rev Neurol. 2015 Jul 16;61(2):94-6.

PMID

26156445.

RESUMEN

El síndrome de Coffin-Lowry (SCL) (OMIM #303600) es una forma de discapacidad intelectual ligada al cromosoma X provocada por mutaciones que afectan a la función del gen *RPS6KA3* (OMIM *300075). Este síndrome está caracterizado por una marcada heterogeneidad en la gravedad y manifestaciones clínicas, tanto en hombres como en mujeres portadoras, aunque la mayoría de las mujeres presentan un fenotipo parcial heterogéneo. Algunos pacientes con el SCL manifiestan episodios de caída repentina sin pérdida del conocimiento provocados por estímulos auditivos o táctiles inesperados que normalmente debutan a la edad de 4 a 17 años. La mayoría de los pacientes con el SCL y estos episodios de caída son varones, mientras que sólo alrededor de un tercio son mujeres. En este artículo se describe el fenotipo de una paciente de 12 años que cumple los criterios diagnósticos del SCL clásico, con discapacidad intelectual sindrómica de grado moderado, rasgos faciales dismórficos, hipotonía muscular, anomalías esqueléticas y manos blandas y anchas con dedos ahusados. Además, manifiesta episodios de caída brusca inducidos por estímulos inesperados. Las pruebas genéticas efectuadas a la paciente permitieron identificar una deleción hemicigota de 187,06 kb en la región Xp22.12 que afecta a 21 de los 22 exones del gen *RPS6KA3*. Se desconocen los mecanismos causantes de la pérdida de tono muscular y caída repentina, aunque la presencia de esta manifestación en algunos de los pacientes con el SCL, incluyendo la paciente aquí descrita, sugiere que el gen *RPS6KA3* podría jugar un papel importante.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=26156445>





ARTÍCULO VII. Copy number variation analysis of patients with autism spectrum disorder from NW Spain

AUTORES

Inés Quintela, Raquel Cruz, Montse Fernández-Prieto, Lorena Gómez-Guerrero, Jesús Eiris, Patricia Blanco, Luz Míguez, Francisco Barros, Ángel Carracedo.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Manuscrito en preparación.

DOI


No disponible.


RESUMEN

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by deficiencies in communication skills, social interaction and language development, usually accompanied by restricted interests and/or repetitive stereotypies. The etiology of this neurodevelopmental disorder includes both environmental and genetic factors and, although the heritability is estimated high, a significant proportion of patients remains without a conclusive genetic diagnosis. Nevertheless, technological advances in recent years, mainly chromosomal microarray and next generation sequencing technologies, have revealed that high-impact rare variants - including chromosomal abnormalities, submicroscopic copy number variants (CNVs), small insertions and deletions (*indels*) and single nucleotide variants (SNVs)- represent a substantial proportion of the risk of ASD. Here, we have applied a genome-wide high density SNP microarray in a cohort of 310 Galician patients with ASD and found 85 rare exonic CNVs that were classified into three groups: Clinically relevant (20/85; 23.5 %), of uncertain clinical significance (55/85; 64.7 %) and benign (10/85; 11.8 %). The 20 pathogenic CNVs were identified in 18 patients, while 8 uncertain but likely causal CNVs were detected in 8 individuals (two of whom also carried a clinically relevant CNV), yielding a diagnostic capability ranged from 5.8 % to 7.7 %. Overall, we have confirmed that ASD is a genetically heterogeneous condition and emphasized the importance of using genome-wide high density SNP microarrays in the detection of its genetic causes.



COPY NUMBER VARIATION ANALYSIS OF PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDER FROM NW SPAIN

Quintela Inés¹, Cruz Raquel², Fernández-Prieto Montse³, Gómez-Guerrero Lorena³, Eirís Jesús⁴, Blanco Patricia³, Míguez Luz³, Barros Francisco³, , Carracedo Ángel^{1,3,5}

 Corresponding author

¹Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Centro Nacional de Genotipado-Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos-Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCI). Santiago de Compostela, Spain.

²Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER)-ISCI. Santiago de Compostela, Spain. ³Grupo de Medicina Xenómica, CIBERER-ISCI, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica - SERGAS. Santiago de Compostela, Spain. ⁴Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. Unidad de Neurología Pediátrica. Departamento de Pediatría. SERGAS. Santiago de Compostela, Spain. ⁵King Abdulaziz University, Center of Excellence in Genomic Medicine Research. Jeddah, Saudi Arabia.

CORRESPONDING AUTHOR CONTACT INFORMATION

Francisco Barros, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Edificio Consultas Externas, planta -2. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. 15707 Santiago de Compostela, Spain.

KEY WORDS

Autism spectrum disorder, intellectual disability, SNP microarray, chromosome microarray analysis, copy number variation, incomplete penetrance, variable expressivity, multiple-hit model, diagnostic yield.

RUNNING HEADS

Authors: Quintela et al.

Shorter version of the title: CNV analysis of ASD patients from NW Spain.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is characterized by deficiencies in communication skills, social interaction and language development, usually accompanied by restricted interests and/or repetitive stereotypies. The etiology of this neurodevelopmental disorder includes both environmental and genetic factors and, although the heritability is estimated high, a significant proportion of patients remains without a conclusive genetic diagnosis. Nevertheless, technological advances in recent years, mainly chromosomal microarray and next generation sequencing technologies, have revealed that high-impact rare variants -including chromosomal abnormalities, submicroscopic copy number variants (CNVs), small insertions and deletions (*indels*) and single nucleotide variants (SNVs)- represent a substantial proportion of the risk of ASD. Here, we have applied a genome-wide high density SNP microarray in a cohort of 310 Galician patients with ASD and found 85 rare exonic CNVs that were classified into three groups: Clinically relevant (20/85; 23.5 %), of uncertain clinical significance (55/85; 64.7 %) and benign (10/85; 11.8 %). The 20 pathogenic CNVs were identified in 18 patients, while 8 uncertain but likely causal CNVs were detected in 8 individuals (two of whom also carried a clinically relevant CNV), yielding a diagnostic capability ranged from 5.8 % to 7.7 %. Overall, we have confirmed that ASD is a genetically heterogeneous condition and emphasized the importance of using genome-wide high density SNP microarrays in the detection of its genetic causes.

ABBREVIATIONS

ASD: Autism Spectrum Disorder; CNVs: Copy Number Variants; *indels*: insertions and deletions; SNVs: Single Nucleotide Variants; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; ID: Intellectual Disability; DD: Developmental Delay; ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; MCA: Multiple Congenital Anomalies; DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition; ADOS-G: Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic; ADI-R: Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), Leiter-R: Leiter International Performance Scale-Revised; PPVT-III: Peabody Picture Vocabulary Test-III; K-SADS-PL: Kiddie-SADS (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children)-Present and Lifetime; FISH: Fluorescence In Vitro Hybridization; MRI: Magnetic Resonance Imaging; bp: base pairs; PCR: Polymerase Chain Reaction; ChAS: Chromosome Analysis Suite; QC: Quality Control; MAPD: Median Absolute Pairwise Difference; IBD: Identical-By-Descent; PCA: Principal Component Analysis; SCZ: schizophrenia; DGV: Database of Genomic Variants; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; ISCA: International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium; NAHR: Non Allelic Homologous Recombination; LCRs: Low-Copy Repeats; SDs: Segmental Duplications; HERV: Human Endogenous Retrovirus.

INTRODUCTION

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by impairments in communication skills, social interaction and language development and the presence of restricted interests and/or repetitive stereotyped behaviors (APA 2000; APA 2013). The ASD prevalence is approximately 0.6-1.5 % (Elsabbagh et al. 2012; APA 2013; Christensen et al. 2016) and it affects 3-4.5 times more males than females (Gillberg et al. 2006; Betancur 2011; Miles 2011; Christensen et al. 2016). Family and twin studies have provided strong evidence that genetic factors play a key role in the etiology of ASD (Ozonoff et al. 2011; Ronald and Hoekstra 2011), with estimates of heritability in the range of 40-80 % (Geschwind 2011; Hallmayer et al. 2011).

Although the basis of this heritability remains largely unexplained, recent genomic studies have revealed that a substantial proportion of ASD risk resides in rare variants of moderate-to-large effect, ranging from chromosomal abnormalities and submicroscopic copy number variants (CNVs) (Sebat et al. 2007; Marshall et al. 2008; Glessner et al. 2009; Itsara et al. 2010; Pinto et al. 2010; Bremer et al. 2011; Levy et al. 2011; Sanders et al. 2011; Prasad et al. 2012; Girirajan et al. 2013a; Girirajan et al. 2013b; Krumm et al. 2013; Matsunami et al. 2013; Menashe et al. 2013; Poultney et al. 2013; Walker and Scherer 2013; Pinto et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015; Yuen et al. 2015) to small insertions and deletions (*indels*) and single nucleotide variants (SNVs) (Awadalla et al. 2010; O'Roak et al. 2011; Buxbaum et al. 2012; Chahrour et al. 2012; Iossifov et al. 2012; Michaelson et al. 2012; Nava et al. 2012; Neale et al. 2012; O'Roak et al. 2012a; O'Roak et al. 2012b; Sanders et al. 2012; Jiang et al. 2013; Lim et al. 2013; Shi et al. 2013; Toma et al. 2013; Yu et al. 2013; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Krumm et al. 2015; Sanders et al. 2015; Yuen et al. 2015). Together, these studies have mainly yielded non-overlapping genes, evidencing the high genetic heterogeneity of this disorder, in line with predictions that there might be approximately 1,000 loci implicated in ASD (Buxbaum et al. 2012) and that the risk variants identified so far only represent a small proportion of the overall estimated heritability.

The clinical interpretation of CNV findings is not always straightforward (Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013), being hampered by the fact that some of the ASD loci are characterized by incomplete penetrance and variable expressivity (Malhotra and Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013) and the possibility of concurrence of multiple genetic variants within a single genome (Girirajan et al. 2010). Here, we evaluate the utility of a genome-wide high density SNP microarray in the detection of clinically relevant CNVs in DNA samples from 334 patients with a diagnosis of ASD from Galicia (NW Spain).

MATERIALS AND METHODS

1. Patients and clinical assessment

A total of 334 Galician (NW Spain) patients were referred to the Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (Santiago de Compostela, Spain) for genetic study by means of genome-wide SNP arrays. All participants had a clinical diagnosis of ASD with or without additional medical manifestations (mainly, intellectual disability (ID)/developmental delay (DD), attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), multiple congenital anomalies (MCA) and/or dysmorphic features). The age at assessment ranged from 3 to 18 years and the male-to-female gender ratio was 3.7:1 (263 males and 71 females). The ASD, ID/DD and ADHD diagnoses were based on the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5). Patients underwent a clinical and neurocognitive assessment, which included the Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic (ADOS-G), the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R), the Leiter International Performance Scale-revised (Leiter-R), the Peabody Picture Vocabulary Test-III (PPVT-III) and/or a psychiatric evaluation using the semi-structured diagnostic interview Kiddie-SADS (Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia for School-Age Children)-Present and Lifetime (K-SADS-PL). Exclusion criteria were: (1) Patients with a non-genetic etiological diagnosis, (2) patients with a clinically recognizable syndrome, or (3) patients positive for conventional cytogenetics (karyotyping and/or FISH) and/or Fragile X syndrome.

Clinical data was provided by the referring physician and included a medical history (i.e. anamnesis, personal and family histories and physical examination) and basic complementary tests including haemogram test, conventional biochemical profile, thyroid hormone profile (FT3, FT4 and TSH), brain MRI, abdominal ultrasound, bone scan, cardiac examination, hearing test and ophthalmological examination.

The parents or legal representatives gave their written informed consent and the study was approved by the local ethical committee (Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia; 2012/098).

2. Microarray-based copy number variation analysis and quality control

Genomic DNA was obtained from peripheral blood and isolated using Chemagic DNA Blood100 kit, following the manufacturer's user manual (Chemagic DNA Blood100 kit protocol) (PerkinElmer Chemagen Technologies GmbH, Germany).

DNA samples were then genotyped using the CytoScan High-Density SNP array following strictly the manufacturer's instructions (Affymetrix CytoScan™ Assay User Manual) (Affymetrix, Santa Clara, CA, US). This array has a genome-wide design with a coverage of approximately 2.7 million markers for the detection of chromosomal aberrations at a gene level and includes 743,304 SNPs. Briefly, the protocol started

with the digestion of 250 ng of total genomic DNA with the *Nsp* I restriction enzyme to generate fragments of 200 to 1,100 base pairs (bp). These fragments were then ligated to a *Nsp* I adaptor, amplified through PCR, purified using para-magnetic beads and fragmented to less than 200 bp using the DNase I enzyme. Fragmented DNA was end-labeled and hybridized to the CytoScan High-Density SNP cartridge. The samples were finally washed, stained and scanned -steps controlled by the Affymetrix GeneChip Command Console software, version 4.1.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)- and image files were automatically processed for allele calling and quality control assessment.

Chromosomal microarray-based analysis was performed using the Chromosome Analysis Suite (ChAS) software, version 1.2.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) and genomic imbalances were annotated based on the GRCh37/hg19 Genome Build (Feb 2009). The main quality control (QC) parameters were the Median Absolute Pairwise Difference (MAPD) and SNP-QC scores for copy number and SNP probes, respectively. Samples with MAPD >0.25 and SNP-QC <15 were excluded from the analysis. Samples were also checked for duplicates and relatives with an IBD (Identical-By-Descent) analysis using Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (Purcell et al. 2007). Those pairs showing an IBD value >0.185 were evaluated (Anderson et al. 2010) and only one individual from each pair was retained. In addition, outliers were identified by Principal Component Analysis (PCA) and samples whose PC loadings were more than six standard deviations away from the mean of PC1 or PC2 were discarded (Price et al. 2006). Finally, samples that passed QC metrics but showed chromosomal abnormalities longer than > 7.5 Mb or long runs of homozygosity and patients with phenotypically recognizable syndromes were excluded from the main analyses. A cutoff of >7.5 Mb was selected to be consistent with large cytogenetically visible chromosome abnormalities as recommended by (Pinto et al. 2014).

For patients with abnormal microarray findings, parental testing was undertaken, when possible, in order to determine the origin of the deletion and/or duplication. For this purpose, chromosomal microarray analysis (using the Affymetrix CytoScan 750K SNP array and following the manufacturer's recommendations) and/or standard karyotyping or FISH (in cases where a parental balanced translocation/inversion was a potential underlying explanation for the patient's genotype) were performed.

After sample filtering, all CNVs went through further QC filtering. Firstly, adjacent chromosomal aberrations in the same sample were merged into one single CNV when the gap between them was less than 50% of their combined length. Second, CNVs were then excluded if: (1) they were detected with a mean probe density (the length of the segment divided by the number of markers within the segment) greater than 2.5 kb, (2) were covered by less than 140 and 60 markers for copy number gains and losses, respectively (values obtained from the 90th percentile of the distribution of gains and losses, observed in a preliminary analysis of this study after excluding those CNVs with a mean marker distance higher than 2.5 kb), (3) were less than 100 kb in

length, or (4) were chromosome Y-CNVs. These quality settings exceeded the standard thresholds recommended by Affymetrix and were also more conservative than those previously established in the literature after experimental validation (Uddin et al. 2015). Finally, the remaining high quality CNVs were merged together and non-exonic CNVs were filtered out using an in-house developed program (ExonReducer3).

3. CNV classification criteria

To assess the clinical relevance for a particular CNV, we first classified exonic CNVs previously associated with neurodevelopmental phenotypes and schizophrenia (SCZ) from the list of CNV regions analyzed by Kirov et al. [2013]. As these authors previously defined, a CNV was called as covering a CNV locus if it spanned >50 % of the region commonly accepted for that CNV. In the case of loci that include only single genes, CNVs that intersected at least one exon of the gene in question were accepted for evaluation (Kirov et al. 2013). Second, we used an in-house developed program to filter out copy number polymorphisms; i. e., CNVs present in > 1 % of our patient data and in > 1 % of 641 healthy controls of European ancestry genotyped with the same microarray platform (provided by Affymetrix), as well as those CNVs considered as common variation in the Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) were excluded for further analyses. For that purpose, exonic CNVs with > 50 % of overlap were considered the same aberration. These two sets of CNVs ("Kirov CNVs" and CNVs at frequency < 1 %) were merged together for classification and later referred to as "rare exonic CNVs".

Several curated clinical and genomic databases, such as OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>), DECIPHER (Database of genomic variation and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; <https://decipher.sanger.ac.uk/>), ISCA (International Standards for Cytogenomic Arrays Consortium) database (<http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>), Clinical Genomic Database (<http://research.nhgri.nih.gov/CGD/search/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), and ClinGen Dosage Sensitivity Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>), as well as published literature (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) were then used to group these rare exonic CNVs into the following classes: (1) **Clinically relevant**, if they were previously reported as a risk factor or causal for ASD or any other neurodevelopmental or psychiatric disorder or if a clinical impact on the phenotype could be definitively established, based on their type (gain or loss), size (those aberrations larger than 3 Mb were all considered as clinically significant (Kearney et al. 2011)), location, gene content and/or inheritance pattern; (2) **of uncertain clinical significance** if, at the time of reporting, it was not possible to unambiguously determine their effect on the phenotype and (3) **benign**, if they only covered non-coding RNAs, were gene-poor (maximum of 2) with no evidence of association with the phenotype for any of the genes within the aberration and/or were well-documented as a benign variant in multiple peer-reviewed publications and/or curated databases. CNVs reported as of

uncertain clinical significance were subclassified as: (A) *likely pathogenic* if: (1) there was evidence in the literature of patients with similar genotype and phenotype, but this was not conclusive to be considered definitely pathogenic; (2) there were multiple examples of equivalent CNVs mostly considered probably causal in patient repositories (e. g., ISCA or DECIPHER); (3) they were deletions encompassing candidate genes for autosomal dominant forms of ASD/ID and/or (4) they partially overlapped with a known genomic syndrome and included relevant gene/s for the phenotype; (B) *non subclassified*, a broad category including those rare exonic CNVs that did not meet the criteria to be grouped as (likely) pathogenic or (likely) benign; for example, unknown CNVs found in more than one patient in our internal database or if there was insufficient, contradictory or inconclusive information in the literature or curated databases and (C) *likely benign*, when there was no evidence of association with the phenotype for any of the genes within the aberration, but the number of genes exceeded the maximum established for benign variants.

RESULTS

1. Sample distribution and quality control

From our initial cohort of 334 participants with ASD (263 males and 71 females; gender male-to-female ratio of 3.7), a total of 12 samples were excluded after quality control filtering based on MAPD and SNP-QC scores. Nine siblings and 3 patients with chromosomal abnormalities longer than 7.5 Mb were also discarded from CNV classification, resulting in a final cohort of 310 individuals (Table I).

2. Microarray-based copy number variation analysis

In our final cohort of 310 ASD patients, we identified 71 individuals with at least one rare exonic CNV, which represents 22.9 % of the total sample. The number of patients with CNVs and the distribution by gender are shown in Table II.

These 71 patients carried a total of 85 rare exonic CNVs which contained a median of 4 genes (mean of 9) and ranged in size from 103,672 to 4,964,068 bp, with a median size of 397,407 bp (mean of 795,707 bp). The CNV distribution by gender is also shown in Table II.

3. CNV classification and clinical interpretation

By using the classification criteria described in the "Material and Methods" section, the 85 rare exonic CNVs detected in our patients were classified into three groups: (1) **Clinically relevant** (20/85; 23.5 %) (Table III), (2) **of uncertain clinical significance** (55/85; 64.7 %) (Table IV) and (3) **benign** (10/85; 11.8 %) (Table V) (Figure I).

Clinically relevant CNVs: The first group included 20 diagnostic CNVs (8 gains and 12 losses) that were subclassified as: *known recurrent microdeletion or microduplication*

syndromes (Category A; 12/85 (14.1 %) CNVs; 7 gains and 5 losses), *telomeric rearrangements* (Category B; 2/85 (2.4 %) CNVs; 1 gain and 1 loss), *different-sized non recurrent CNVs* (Category C; 3/85 (3.5 %) CNVs; 3 losses) and *monogenic aberrations* affecting a gene known to be associated with ASD and/or any other neurodevelopmental or psychiatric disorder, such as DD/ID or SCZ (Category D; 3/85 (3.5 %) CNVs; 3 losses) (Table III; Figure I). These 20 causal copy number events were found in 18/310 (5.8 %) patients (eight of whom carried two rare exonic CNVs in their genomes), included from 1 to genes ((median of 15; mean of 21) and their lengths ranged from 116,624 to 4,964,068 bp (median of 1,230,334 bp; mean of 1,642,470 bp).

CNVs of uncertain clinical significance: This second group included 55 CNVs (42 gains and 13 losses) of unknown significance, that were subclassified as: *likely pathogenic* (Category A; 8/85 (9.4 %) 8 CNVs; 7 gains and 1 loss), *non subclassified* (Category B; 40/85 (47.1 %) CNVs; 28 gains and 12 losses) and *likely benign* (Category C; 7/85 (8.2 %) CNVs; 7 gains) (Table IV; Figure I). These chromosomal imbalances were found in 50/310 (16.1 %) patients (five of whom carried 2 variants of uncertain significance, while 7 combined the uncertain CNV with a pathogenic (n = 6) or a benign (n = 1) event), encompassed from 1 to 43 genes (median of 4; mean of 5) and ranged in size from 103,672 to 2,966,603 bp (median of 358,846 bp; mean of 584,180 bp).

Benign CNVs: Finally, a total of 10/85 (11.8 %) CNVs (4 gains and 6 losses) were considered benign for ASD (Table V; Figure I). They were detected in 10/310 (3.2 %) patients and their sizes were in the range of 115,149 to 467,601 bp (median of 175,184 bp; mean of 229,966 bp).

4. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis

The 20 CNVs considered clinically relevant in our study were identified in 18 patients (13 males and 5 females), which means that our approach has a diagnostic yield of 5.8 %. If CNVs classified as likely pathogenic could be finally considered clinically relevant, this diagnostic yield might reach up to 7.7 % of our patients.

DISCUSSION

1. Sample distribution and quality control

Autism spectrum disorder is approximately 3 to 4 times more prevalent in males, even reaching a male-to-female ratio of 10:1-11:1 in presentations with normal cognitive abilities (Gillberg et al. 2006; Betancur 2011; Miles 2011). In keeping with this, the male-to-female ratio in our cohort was 3.7 (Table I).

From the 310 patients with ASD genotyped in our study, 96.4 % of samples passed quality control and only 0.97 % (n=3) of them were excluded from the analysis for presenting chromosomal abnormalities longer than 7.5 Mb (Table I). No additional patient had to be excluded for having long runs of homozygosity or a clinically recognizable syndrome, an expected result taking into account our sample selection criteria.

2. Microarray-based copy number variation analysis

We found at least one rare exonic CNV in 22.9 % of our ASD patients, and although we obtained a higher CNV detection rate in males than in females (Table II), this difference was not statistically significant ($P = 0.3148$, Fisher's exact test). This is in line with a previous study on 215 patients (150 with learning disabilities and 65 with ASD) genotyped with oligonucleotide-arrays, in which chromosomal abnormalities were detected in 21 % of the sample, with no statistical difference between males and females (Roberts et al. 2014). Similarly, a CNV detection rate of 22.06 % (23.76 % in males and 19.04 % in females) was found in a cohort of 349 patients with DD/ID/ASD and dysmorphic features genotyped with different microarray platforms (Battaglia et al. 2013) and 26.1 % of 195 ASD patients of Greek origin, recently evaluated by aCGH, carried at least one rare CNV in their genomes (Oikonomakis et al. 2016). As shown in Table II, fourteen out of our 310 (4.5 %) patients carried more than one rare exonic chromosome rearrangement. This is comparable to the frequencies obtained from previous independent studies that used similar array platforms in patients with neurodevelopmental phenotypes, including ASD; thus, Battaglia et al. [2013] identified two concomitant chromosome aberrations in 16 of 349 (4.6 %) samples (Battaglia et al. 2013) and Oikonomakis et al. [2016] found that 12 of 195 (6.1 %) individuals in their cohort had more than one non-polymorphic copy number event (Oikonomakis et al. 2016).

The CNV detection rate was higher for gains than for losses in the total sample (63.53 % versus 36.47 %) and in males (67.12 % versus 32.88 %) but not in females (41.67 % versus 58.33 %) (Table II). In that sense, Battaglia et al. [2013] reported more deletions (n = 58) than duplications (n = 33) in their cohort and stated that both technical and biological factors could explain their findings (Battaglia et al. 2013). However, we suggest that these results must be considered with caution and additional factors, such as sample selection criteria, cohort size, array resolution, CNV detection algorithm, QC thresholds for CNV definition and/or CNV classification criteria, must also be considered before establishing conclusions and comparisons across publications.

3. CNV classification and clinical interpretation

Clinically relevant CNVs (Figure I; Table III):

Following the classification criteria described in the "Material and Methods" section, we could definitively infer the clinical impact of 23.5 % of the CNVs detected in our cohort (Figure I; Table III).

Known recurrent genomic disorders (Figure I; Table III, Category A; 12/85 (14.1 %) CNVs): Eleven out of our 310 (3.5 %) patients were found to carry a known microdeletion or microduplication. These recurrent common-sized genomic rearrangements are typically mediated by non allelic homologous recombination (NAHR) in unstable genomic regions, frequently due to the presence of low-copy repeats (LCRs) or segmental duplications (SDs). They have been implicated in several neurodevelopmental and behavioral disorders (such as ASD, DD/ID, ADHD and MCA), epilepsy and/or psychiatric disorders (such as SCZ) and are also commonly characterized by incomplete penetrance (Malhotra and Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013). The underlying causes of this heterogeneity are not completely clear, being the multiple-hit hypothesis (Girirajan et al. 2010) a plausible explanation. Interestingly and in line with this model, five out of these 11 (45.4 %) patients carried a second CNV (See Table III, Category A). The existence of additional factors -genetic (*indels* or SNVs), epigenetic and/or environmental modifiers- might also explain the phenotypic variability and incomplete penetrance seen in these patients.

Besides LCRs/SDs, the presence in the human genome of high-copy repeats -such as human endogenous retrovirus (HERV) elements- increases genomic instability, provides ideal substrates for NAHR events (Chen et al. 2014) and, consequently, also contributes to the formation of CNVs, as is the case of the recently discovered recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion (Shuvarikov et al. 2013; Campbell et al. 2014). This CNV has been mainly associated to cognitive disorder, motor and language delays and hypotonia (Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013) and has been detected in our Patient ASD_53 (arr[hg19] 3q13.2q13.31(112,144,081-115,514,432)x1 dn) ((Quintela et al. 2015b); [ARTÍCULO VIII](#)).

Telomeric rearrangements (Figure I; Table III, Category B; 2/85 (2.4 %) CNVs) were only detected in one (0.3 %) sample: Patient ASD_62 (arr[hg19] 19q13.43(57,561,530-58,956,888)x3 dn,22q13.32q13.33(48,425,456-51,197,838)x1 dn), a 16 year-old male with ASD, carried a 19qter copy number gain in combination with a 22qter loss. The 19q terminal aberration has a size of 1.4 Mb and encompasses 57 genes, although none of them is listed as a morbidity gene in the OMIM database. The 22q13.32q13.33 terminal loss affects 2.7 Mb of DNA sequence and involves 42 genes, two of them implicated in autosomal recessive forms of ID -i. e., *ALG12* (OMIM 607144), causal for congenital disorder of glycosylation, type Ig (OMIM 607143) and

CHKB (OMIM 612395), associated with congenital muscular dystrophy, mitochondrial structural abnormalities and ID (OMIM 602541)- and, more relevant for our patient's phenotype, includes *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*; OMIM 606230). This gene is located within the minimum critical region known to be responsible of the Phelan-McDermid syndrome (OMIM 606232), a genomic disorder mainly characterized by neonatal hypotonia, global developmental delay, absent to severely delayed speech, autistic behavior and minor dysmorphic features.

Different-sized non recurrent pathogenic CNVs (Figure I; Table III, Category C; 3/85 (3.5 %) CNVs) were detected in 3 out of 310 (0.97 %) patients. As a representative example of this category, the clinical description and molecular findings of Patient ASD_109 (arr[hg19] Xp22.31(6,446,579-8,135,644)x2 mat,6q14.1q15(83,648,997-88,613,065)x1 not mat) have been recently published by our group (Quintela et al. 2015a); [ARTÍCULO IX](#)).

Monogenic exonic CNVs disrupting ASD/DD/ID/SCZ genes (Figure I; Table III, Category D; 3/85 (3.5 %) CNVs) were identified in 3 (0.97 %) patients. The clinical features and molecular findings of two of them [Patient ASD_229 (arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3, 2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1) and Patient ASD_221 (arr[hg19] 2p16.3(51,027,613-51,161,647)x1)], carrying deletions partially encompassing *NRXN1* (*Neurexin 1*; OMIM 600565), are summarized as Supplemental Data of this manuscript. The clinical report of Patient ASD_60 (arr[hg19] 7q11.22(69,914,440-70,297,558)x1 not mat), who presented an *AUTS2* (OMIM 607270) microdeletion, is also available (see Patient 2 in [ARTÍCULO X](#)).

CNVs of uncertain clinical significance (Figure I; Table IV) and **benign CNVs** (Figure I; Table V):

Following the classification criteria detailed in the "Material and Methods" section, we could not definitively infer the clinical significance of 64.7 % of the CNVs detected in our cohort, while the remaining 11.8 % of aberrations were considered benign (Figure I; Tables IV and V, respectively). The variants of uncertain clinical significance represented a broad group of CNVs for which, at the time of classification, was not possible to unequivocally determine their pathogenicity. The majority of these CNVs are very rare and have not yet been reported in neither control nor affected individuals. Therefore, our classification should not be considered as unique or definitive; on the contrary, as previously suggested (Palmer et al. 2013), it may eventually change as more patients are submitted to databases and more knowledge and sufficient evidences are available in the literature.

As illustrative examples of chromosomal imbalances of yet unclear clinical relevance, the phenotype and molecular data of Patient ASD_300 (arr[hg19] 8p21.3(19,194,170-21,760,673)x1) and Patient ASD_222 (arr[hg19] 17p13.3(2,534,709-2,766,781)x3 not mat,18q23(76,772,006-77,045,710)x3 not mat) are summarized as Supplemental Data

of this manuscript. Additionally, the potential pathogenicity of subtelomeric Xp22.31 copy number gains -carried by our Patients ASD_109 (arr[hg19] Xp22.31(6,446,579-8,135,644)x2 mat,6q14.1q15(83,648,997-88,613,065)x1 not mat) and ASD_230 (arr[hg19] Xp22.31(6,630,120-8,135,644)x2,7p22.3(1,201,674-1,817,997)x3)- has also been discussed (see clinical report of Patient ASD_109 (Quintela et al. 2015a); [ARTÍCULO IX](#)).

4. Diagnostic yield of chromosomal microarray analysis

By using a genome-wide high density SNP microarray, a total of 20 causative CNVs were detected in 18 of our ASD patients and 8 likely pathogenic CNVs were identified in another 8 samples (two of them also with a clinically relevant CNV), which means that the diagnostic yield in this cohort ranged from 5.8 % to 7.7 %. These values were significantly lower than the 11.2 % ($P = 0.0103$, Fisher's exact test) to 13.6 % ($P = 0.0109$, Fisher's exact test) obtained in our series of ID Galician patients (data not shown; [ARTÍCULO I](#)), also evaluated with genome-wide high density SNP platforms under the same CNV classification criteria. This could imply that the diagnostic capability of this microarray-based approach depends on the phenotype. In agreement with our results, Roberts et al. [2014] obtained an overall diagnostic yield of 15.34 % in their cohort of patients with either autism/ASD ($n = 65$) or DD/learning disabilities ($n = 150$), while differences were observed when the usefulness of their strategy was evaluated by phenotype (9.2 % in ASD *versus* 18 % in DD/learning disabilities) (Roberts et al. 2014). The utility of chromosomal microarray analysis has been tested in previous cohorts of ASD patients and was found to be highly variable across publications (Bremer et al. 2011; Battaglia et al. 2013; Wisniewiecka-Kowalnik et al. 2013; Gazzellone et al. 2014; Nava et al. 2014; Carreira et al. 2015; Oikonomakis et al. 2016). It seems, therefore, that explanations others than phenotype and sample selection criteria, as cohort size, array resolution, CNV detection algorithm, QC parameters for CNV definition and/or CNV classification criteria, may also contribute to these differences. In our study, the application of very conservative QC thresholds and the fact that only exonic CNVs were considered for clinical interpretation may have led to miss some disease-associated variants. In fact, it is known that chromosomal aberrations involving, for example, regulatory elements within intronic and/or intergenic DNA sequences may be clinically relevant as well (Spielmann and Klopocki 2013; Turner et al. 2016). Additionally, as previously suggested (Palmer et al. 2013), the interpretation of chromosomal microarray data can change over time, which means that the diagnostic yield might vary as long as new studies emerges and databases are updated.

Although it is becoming evident that the application of high-resolution chromosomal microarrays in the clinics is favoring the identification of submicroscopic CNVs not previously detected by conventional cytogenetics, the interpretation of these genetic findings is not always straightforward (Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013), and is even more challenging when multiple genetic variants coexist within a

single genome. In our ASD cohort, eight of 18 (44.4 %) patients in whom a conclusive diagnosis could be established carried two chromosomal copy number events. Interestingly, one of them presented a complex rearrangement consisting in two known genomic disorders at chromosome 1q21.1, while 4 patients carried variants of uncertain significance in combination with a known genomic disorder characterized by incomplete penetrance and variable expressivity (i.e., 15q11.2 microdeletion, 15q11.2 microduplication, 16p13.11 microduplication and 22q11.21 microduplication; Table III). These results are in agreement with previous findings on ASD cohorts (Battaglia et al. 2013; Nava et al. 2014; Oikonomakis et al. 2016) and support the "two-hit model" previously proposed for neurodevelopmental disorders (Girirajan et al. 2010).

5. Conclusions

Summarizing our findings, the application of a genome-wide high density SNP microarray in a cohort of 310 Galician patients with ASD allowed us the identification of 85 rare exonic CNVs -classified as clinically relevant (23.5 %), of uncertain clinical significance (64.70 %) and benign (11.8 %)- in 71 (22.9 %) patients. Confirming the utility of chromosomal microarray analysis in the clinics, the diagnostic yield in our cohort currently ranged from 5.8 % to 7.7 %. In addition, our results provided further evidence of the complexity of data interpretation, especially for genomic disorders characterized by incomplete penetrance and variable expressivity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their collaboration. We also appreciate the contribution of the Fundación María José Jove and Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Genotyping services were provided by the Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos - Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCIII); Grant PRB2 (IPT13/0001 - ISCIII-SGEFI / FEDER).



FIGURE AND TABLES

Figure I: Rare exonic CNVs identified in our ASD patients. Rare exonic CNVs (n=85) identified in our total cohort of 310 patients with ASD. The number and percentage of events are in parentheses.

Table I: Sample distribution and quality control. QC Filter 1: Patients excluded after QC filtering based on MAPD and SNP-QC scores. QC Filter 2: Siblings of probands. QC Filter 3: Patients with CNVs (Copy Number Variants) longer than 7.5 Mb: Klinefelter syndrome (XXY; 1 patient) and XYY syndrome (2 patients). Abbreviations: QC: Quality Control; M: Male; F: Female.

Table II. Summary of microarray data. Abbreviations: CNVs: Copy Number Variant; CN: Copy Number. M: Male; F: Female.

Table III: Clinically relevant CNVs sorted by chromosome. (*) Age at diagnosis. (**) Variants of uncertain clinical significance and benign CNVs present in these patients are shown in grey. (***) A: *Known recurrent genomic disorder*; B: *Telomeric rearrangement*; C: *Different-sized non recurrent pathogenic CNV* and D: *Monogenic exonic CNV disrupting ASD/DD/ID/SCZ genes*. (****) OMIM genes are shown in bold. Abbreviations: y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table IV: CNVs of uncertain clinical significance sorted by category (A: *Likely pathogenic CNVs*. B: *Non-subclassified CNVs*. C: *Likely benign CNVs*) and chromosome. (*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional benign CNV (shown in grey). (2) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). (3) Patient with 2 variants of unknown clinical significance (second hit shown in grey if belongs to a different category). Abbreviations: CNVs: y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table V: Benign CNVs sorted by chromosome. (*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional variant of unknown clinical significance (shown in grey). Abbreviations: y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; mat: maternally inherited; bp: base pairs.



Figure I: Rare exonic CNVs identified in our ASD patients. Rare exonic CNVs (n=85) identified in our total cohort of 310 patients with ASD. The number and percentage of events are in parentheses.

Rare exonic CNVs (n=85)

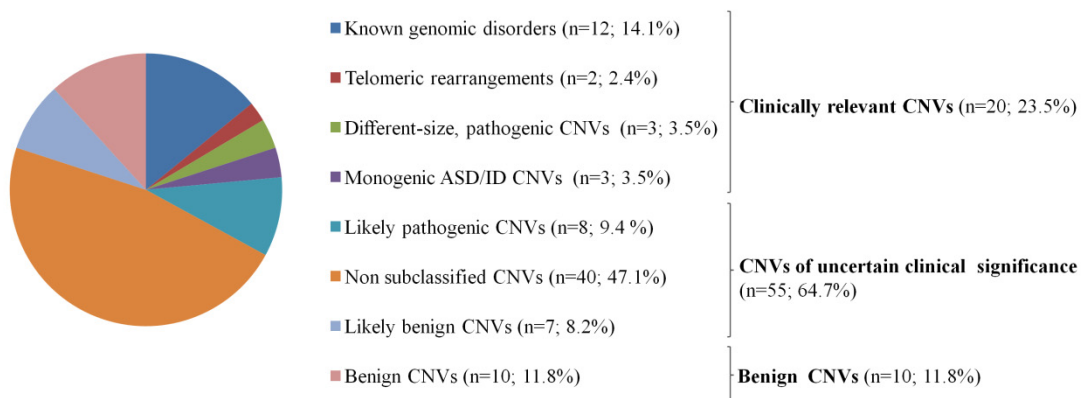




Table I: Sample distribution and quality control. QC Filter 1: Patients excluded after QC filtering based on MAPD and SNP-QC scores. QC Filter 2: Siblings of probands. QC Filter 3: Patients with CNVs (Copy Number Variants) longer than 7.5 Mb: Klinefelter syndrome (XXY; 1 sample) and XYY syndrome (2 samples).

	TOTAL	M	F
Initial sample	334	263	71
QC filter 1	12 (3.6%)	8	4
QC filter 2	9 (2.7 %)	4	5
QC filter 3	3 (0.9 %)	3	0
Final sample	310	248	62

Abbreviations: QC: Quality Control; M: Male; F: Female.

Table II. Summary of microarray data.

	TOTAL	M	F
Patients with rare exonic CNVs	71/310 (22.9 %)	60/248 (24.2 %)	11/62 (17.8 %)
Patients with more than 1 rare exonic CNV	14/310 (4.5 %)	13/248 (5.2 %)	1/62 (1.6 %)
Number of rare exonic CNVs	85	73	12
Rare exonic CN gains	54 (63.5 %)	49 (67.1 %)	5 (41.7 %)
Rare exonic CN losses	31 (36.5 %)	24 (32.9 %)	7 (58.3 %)

Abbreviations: CNVs: Copy Number Variant; CN: Copy Number. M: Male; F: Female.



Table III: Clinically relevant CNVs sorted by chromosome.

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ASD_258	3y	M	ASD	arr[hg19] 1q21.1(145,387,023-145,792,051)x1, 1q21.1(146,016,526-147,382,471)x3	A A	405,028 1,365,945	17 genes 11 genes (<i>GJA5, GJA8</i>)
ASD_280	3y	M	ASD, language delay	arr[hg19] 1q21.1(145,895,746-147,819,438)x3 pat	A	1,923,692	14 genes (<i>GJA5, GJA8</i>)
ASD_229	5y	F	See Supplemental Data	arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3, 2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1	- D	1,434,805 1,661,114	11 genes (<i>XDH, SPAST</i>) <i>NRXN1</i>
ASD_221	15y	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 2p16.3(51,027,613-51,161,647)x1	D	134,034	<i>NRXN1</i>
ASD_53	9y	F	See [Quintela et al. 2015b]	arr[hg19] 3q13.2q13.31(112,144,081-115,514,432)x1 dn	A	3,370,351	25 genes (<i>DRD3</i>)
ASD_109	8y	M	See [Quintela et al. 2015b]	arr[hg19] Xp22.31(6,446,579-8,135,644)x2 mat, 6q14.1q15(83,648,997-88,613,065)x1 not mat	- C	1,689,065 4,964,068	<i>VCX3A, HDHD1, STS, VCX, PNPLA4, MIR651</i> 31 genes
ASD_60	8y	F	ASD, moderate-severe ID, severe speech and language disorders, hyperactivity, mild facial dysmorphic features, myopia, astigmatism	arr[hg19] 7q11.22(69,914,440-70,297,558)x1 not mat	D	383,118	<i>AUTS2</i>
ASD_277	3y	F	ASD, psychomotor delay	arr[hg19] 9q34.3(140,418,418-140,544,842)x1	C	126,424	<i>PNPLA7, MRPL41, WDR85, ZMYND19, ARRDC1, C9orf37, EHMT1</i>
ASD_321	6y	M	ASD	arr[hg19] 13q32.1q32.3(95,682,157-99,337,636)x1 mat	C	3,655,479	15 genes
ASD_29	6y	M	ASD	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,282,799)x1 mat	A	512,378	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ASD_174	17y	M	ASD	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,288,350)x3	A	517,929	<i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>
ASD_214	10y	M	ASD	arr[hg19] 6p21.32p21.32(32,965,731-33,123,282)x1, 15q11.2(22,770,421-23,282,799)x1	- A	157,551 512,378	<i>HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DPB2</i> <i>TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMML1, GOLGA8IP, HERC2P2</i>

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN (**)	Category (***)	Size (bp)	Genes (****)
ASD_250	10y	M	ASD, ID, aggressive behaviors	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,291,159)x3, 22q11.22q11.23(22,998,336-25,059,631)x3	A	520,738	<i>TUBGCP5</i> , <i>CYFIP1</i> , <i>NIPA2</i> , <i>NIPA1</i> , <i>WHAMML1</i> , <i>GOLGA8IP</i> , <i>HERC2P2</i>
					-	2,061,295	43 genes (<i>BCR</i> , <i>IGLL1</i> , <i>SMARCB1</i> , <i>MIF</i> , <i>GGT1</i>)
ASD_268	5y	M	ASD	arr[hg19] 8q22.3(104,435,162-104,868,213)x1 dn, 16p13.11(15,449,696-16,544,419)x3 mat	- A	433,051 1,094,723	<i>DCAF13</i> , <i>RIMS2</i> 17 genes (<i>MYH11</i> , <i>ABCC6</i>)
ASD_281	8y	F	ASD	arr[hg19] 17p13.3(899,199-1,974,914)x3	A / C	1,075,715	30 genes (<i>YWHAE</i> , <i>RILP</i> , <i>PRPF8</i> , <i>SERPINF2</i>)
ASD_149	NA	M	ASD	arr[hg19] 17p11.2(16,772,264-20,410,218)x1	A	3,637,954	61 genes (<i>TNFRSF13B</i> , <i>FLCN</i> , <i>RAI1</i> , <i>ATPAF2</i> , <i>MYO15A</i> , <i>ALDH3A2</i> , <i>AKAP10</i>)
					-	404,872	<i>PAPD5</i> , <i>ADCY7</i> , <i>BRD7</i> , <i>NKD1</i>
ASD_244	NA	M	ASD, ADHD	arr[hg19] 16q12.1(50,229,915-50,634,787)x3, 22q11.21(18,645,073-21,465,659)x3	A	2,820,586	61 genes (<i>PRODH</i> , <i>DGCR2</i> , <i>GP1BB</i> , <i>TBX1</i> , <i>COMT</i> , <i>RTN4R</i> , <i>SERPIND1</i> , <i>SNAP29</i>)
					B	1,395,358	57 genes
ASD_62	16y	M	ASD	arr[hg19] 19q13.43(57,561,530-58,956,888)x3 dn, 22q13.32q13.33(48,425,456-51,197,838)x1 dn	B B	2,772,382	42 genes (<i>ALG12</i> , <i>MLC1</i> , <i>SCO2</i> , <i>TYMP</i> , <i>ARSA</i> , <i>SHANK3</i> , <i>ACR</i>)

(*) Age at diagnosis. (**) Variants of uncertain clinical significance and benign CNVs present in these patients are shown in grey. (***) A: Known recurrent genomic disorder; B: Telomeric rearrangement; C: Different-sized non recurrent pathogenic CNV and D: Monogenic exonic CNV disrupting ASD/DD/ID/SCZ genes. (****) OMIM genes are shown in bold. **Abbreviations:** y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table IV: CNVs of uncertain clinical significance sorted by category (A: Likely pathogenic CNVs. B: Non-subclassified CNVs. C: Likely benign CNVs) and chromosome.

A: Likely pathogenic CNVs (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_300	7y	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 8p21.3(19,194,170-21,760,673)x1	2,566,503	<i>SH2D4A, CSGALNACT1, INTS10, LPL, SLC18A1, ATP6V1B2, LZTS1, LOC286114, GFRA2</i>
ASD_35	NA	M	ASD	arr[hg19] 15q13.3(32,019,918-32,444,044)x3	424,126	<i>CHRNA7</i>
ASD_222 (1)	5y	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 17p13.3(2,534,709-2,766,781)x3 not mat, 18q23(76,772,006-77,045,710)x3 not mat	232,072	<i>PAFAH1B1, KIAA0664, MIR1253, RAP1GAP2</i>
ASD_139	9y	M	ASD, moderate ID	arr[hg19] 22q11.22q11.23(22,997,928-23,652,512)x3 mat	654,584	<i>MIR650, IGLL5, RTDR1, GNAZ, RAB36, BCR, FBXW4P1</i>
ASD_250 (2)	10y	M	ASD, ID, aggressive behaviors	arr[hg19] 15q11.2(22,770,421-23,291,159)x3, 22q11.22q11.23(22,998,336-25,059,631)x3	2,061,295	43 genes (<i>BCR, IGLL1, SMARCB1, MIF, UPB1, GGT1</i>)
ASD_289	3y	M	ASD	arr[hg19] 22q11.22q11.23(23,187,341-23,542,711)x3 mat	355,370	<i>IGLL5, RTDR1, GNAZ, RAB36, BCR</i>
ASD_109 (2)	8y	M	See [Quintela et al. 2015b]	arr[hg19] Xp22.31(6,446,579-8,135,644)x2 mat, 6q14.1q15(83,648,997-88,613,065)x1 not mat	1,689,065	<i>VCX3A, HDHD1, STS, VCX, PNPLA4, MIR651</i>
ASD_230 (3)	13y	M	ASD	arr[hg19] Xp22.31(6,630,120-8,135,644)x2, 7p22.3(1,201,674-1,817,997)x3	1,505,524	<i>HDHD1, STS, VCX, PNPLA4, MIR651</i>

B: Non-subclassified CNVs (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_37	NA	M	ASD, bilateral epicanthus, facial asymmetry	arr[hg19] 1q23.1(158,489,545-158,901,127)x1	411,582	11 genes (<i>SPTA1</i>)
ASD_239	3y	M	ASD, language delay	arr[hg19] 2p24.3(15,864,183-16,358,744)x3	494,561	<i>MYCNOS, MYCN</i>

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_229 (2)	5y	F	ASD See Supplemental Data	arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3, 2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1	1,434,805	11 genes (<i>XDH</i> , <i>SRD5A2</i> , <i>SPAST</i>)
ASD_245	9y	M	ASD, behavior problems	arr[hg19] 3p21.31(44,736,375-44,857,813)x1	121,438	<i>ZNF502</i> , <i>ZNF501</i> , <i>KIAA1143</i> , <i>KIF15</i>
ASD_36	6y	M	ASD	arr[hg19] 3p14.1(65,508,964-66,372,903)x3	863,939	<i>MAGI1</i> , <i>SLC25A26</i>
ASD_4	8y	M	ASD	arr[hg19] 3q23(139,176,224-139,827,742)x3	651,518	<i>RBP2</i> , <i>RBP1</i> , <i>NMNAT3</i> , <i>CLSTN2</i>
ASD_96	9y	F	ASD	arr[hg19] 4q34.1(174,151,473-174,510,319)x3	358,846	<i>GALNT7</i> , <i>HMGB2</i> , <i>SAP30</i> , <i>SCRG1</i> , <i>HAND2</i> , <i>NBLA00301</i>
ASD_209 (3)	3y	M	ASD	arr[hg19] 5p15.2p15.1(14,859,852-15,066,898)x3, 5p15.1(16,441,585-17,011,470)x3	207,046 569,885	<i>ANKH</i> <i>ZNF622</i> , <i>FAM134B</i> , <i>MYO10</i>
ASD_104 (3)	13y	M	ASD, obsessive-compulsive behaviors, congenital unilateral deafness	arr[hg19] 5p13.1(40,873,208-41,573,104)x3 mat, 12q21.31q21.32(85,372,865-86,846,209)x1 pat	699,896 1,473,344	<i>C7</i> , <i>HEATR7B2</i> , <i>C6</i> , <i>PLCXD3</i> <i>TSPAN19</i> , <i>LRR1Q1</i> , <i>ALX1</i> , <i>RASSF9</i> , <i>NTS</i> , <i>MGAT4C</i>
ASD_264	6y	M	ASD, severe language delay	arr[hg19] 6p22.1(27,046,945-27,401,326)x3	354,381	11 genes
ASD_252 (3)	6y	M	ASD	arr[hg19] 6p22.1(27,171,404-27,401,326)x3, 6q27(170,168,308-170,548,295)x3	229,922 379,987	<i>PRSS16</i> , <i>POM121L2</i> , <i>FKSG83</i> , <i>ZNF204P</i> , <i>ZNF391</i> <i>C6orf70</i> , <i>NCRNA00242</i> , <i>C6orf208</i>
ASD_214 (2)	10y	M	ASD	arr[hg19] 6p21.32p21.32(32,965,731-33,123,282)x1, 15q11.2(22,770,421-23,282,799)x1	157,551	<i>HLA-DOA</i> , <i>HLA-DPA1</i> , <i>HLA-DPB1</i> , <i>HLA-DPB2</i>
ASD_168	13y	M	ASD	arr[hg19] 6q27(170,168,308-170,548,295)x3	379,987	<i>C6orf70</i> , <i>NCRNA00242</i> , <i>C6orf208</i>
ASD_230 (3)	13y	M	ASD	arr[hg19] Xp22.31(6,630,120-8,135,644)x2, 7p22.3(1,201,674-1,817,997)x3	616,323	<i>UNCX</i> , <i>MICALL2</i> , <i>INTS1</i> , <i>MAFK</i> , <i>TMEM184A</i> , <i>PSMG3</i> , <i>KIAA1908</i> , <i>TFAMP1</i> , <i>ELFN1</i>
ASD_196	3y	M	ASD	arr[hg19] 7q21.13(90,208,373-90,618,130)x1	409,757	<i>CDK14</i>
ASD_268 (2)	5y	M	ASD	arr[hg19] 8q22.3(104,435,162-104,868,213)x1 dn, 16p13.11(15,449,696-16,544,419)x3 mat	433,051	<i>DCAF13</i> , <i>RIMS2</i>
ASD_41	13y	F	ASD	arr[hg19] 9p24.2p24.1(3,475,137-4,613,537)x3 pat	1,138,400	<i>RFX3</i> , <i>GLIS3</i> , <i>C9orf70</i> , <i>SLC1A1</i> , <i>C9orf68</i>
ASD_278	3y	M	ASD, macrocephaly	arr[hg19] 9p24.2p24.1(4,315,100-4,798,385)x1	483,285	<i>SLC1A1</i> , <i>C9orf68</i> , <i>PPAPDC2</i> , <i>CDC37L1</i> , <i>AK3</i> , <i>RCL1</i>
ASD_249	13y	M	ASD, ADHD	arr[hg19] 9p24.2(4,420,340-4,585,050)x1	164,710	<i>SLC1A1</i>

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_187	4y	M	ASD	arr[hg19] 9q21.32q21.33(86,845,673-87,089,584)x3	243,911	<i>SLC28A3</i>
ASD_165	10y	F	ASD	arr[hg19] 10q25.1(108,613,771-108,889,758)x1 mat	275,987	<i>SORCS1</i>
ASD_315	3y	M	ASD	arr[hg19] 11q23.3(116,534,123-116,845,104)x3 no mat	310,981	<i>BUD13, ZNF259, APOA5, APOA4, APOC3, APOA1, SIK3</i>
ASD_260	7y	M	ASD	arr[hg19] 11q24.2(126,462,437-126,677,614)x3 pat	215,177	<i>KIRREL3</i>
ASD_71	6y	M	ASD	arr[hg19] 10p11.21(35,493,887-35,653,529)x3 dn	159,642	<i>CREM, CCNY</i>
ASD_152	10y	M	ASD	arr[hg19] 12p12.2p12.1(21,296,706-21,567,592)x3	270,886	<i>SLCO1B1, SLCO1A2, IAPP</i>
ASD_90	8y	F	ASD	arr[hg19] 13q22.1q22.1(73,335,020-73,488,687)x1	153,667	<i>DIS3, PIBF1</i>
ASD_237	3y	M	ASD, language delay	arr[hg19] 13q22.1(73,365,159-73,468,831)x1	103,672	<i>PIBF1</i>
ASD_274	8y	M	ASD, epilepsy	arr[hg19] 14q21.2q21.3(47,114,303-47,443,671)x3	329,368	<i>RPL10L, MDGA2</i>
ASD_144	8y	F	ASD	arr[hg19] 14q21.2q21.3(47,121,024-47,445,704)x3	324,680	<i>RPL10L, MDGA2</i>
ASD_160	5y	M	ASD	arr[hg19] 16p13.13(11,521,826-12,208,326)x3	686,500	<i>LITAF, SNN, TXNDC11, ZC3H7A, BCAR4, RSL1D1, GSPT1, TNFRSF17, RUNDC2A, SNX29</i>
ASD_12	3y	M	ASD	arr[hg19] 18p11.21(12,918,249-13,183,317)x3	265,068	<i>SEH1L, CEP192</i>
ASD_111 (3)	17y	M	ASD	arr[hg19] 9q34.3(137,644,038-138,163,730)x3 mat, 18p11.21(12,918,249-13,198,053)x3 mat	279,804	<i>SEH1L, CEP192</i>
ASD_86	11y	M	ASD	arr[hg19] 18q12.2(33,748,334-34,813,244)x3	1,064,910	<i>ELP2, MOCOS, FHOD3, C18orf10, KIAA1328</i>
ASD_124	6y	M	ASD	arr[hg19] 20p11.23p11.22(19,122,047-22,088,650)x3 pat	2,966,603	13 genes (<i>RIN2</i>)
ASD_89	6y	M	ASD	arr[hg19] 20q13.13(47,886,502-48,092,011)x3	205,509	<i>ZNFX1, NCRNA00275, SNORD12C, MIR1259, SNORD12B, SNORD12, KCNB1</i>
ASD_20	15y	M	ASD	arr[hg19] 22q11.21(18,916,842-19,244,002)x3 mat	327,160	11 genes (<i>PRODH, DGCR2</i>)
ASD_21	10y	M	ASD, facial dysmorphic features	arr[hg19] Xp22.11(22,863,472-23,062,154)x0	198,682	<i>DDX53</i>

C: Likely benign CNVs (sorted by chromosome)

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_114	18y	M	ASD	arr[hg19] 1p36.32(3,022,449-3,412,390)x3 mat	389,941	<i>PRDM16, MIR4251, ARHGEF16, MEGF6</i>
ASD_220	9y	M	ASD	arr[hg19] 1p34.2(40,146,252-40,401,685)x3	255,433	<i>HPCAL4, PPIE, BMP8B, OXCT2, TRIT1, MYCL1</i>
ASD_91	14y	M	ASD	arr[hg19] 1p34.2(42,559,558-42,771,276)x3	211,718	<i>GUCA2B, GUCA2A, FOXJ3</i>
ASD_111 (3)	17y	M	ASD	arr[hg19] 9q34.3(137,644,038-138,163,730)x3 mat, 18p11.21(12,918,249-13,198,053)x3 mat	519,692	<i>COL5A1</i> , <i>FCN2, FCN1, OLFM1</i>
ASD_301	7y	M	ASD	arr[hg19] 14q32.33(105,366,414-105,604,884)x3	238,470	<i>PLD4, AHNAK2, C14orf79, CDCA4, GPR132</i>
ASD_244 (2)	NA	M	ASD, ADHD	arr[hg19] 16q12.1(50,229,915-50,634,787)x3, 22q11.21(18,645,073-21,465,659)x3	404,872	<i>PAPD5, ADCY7, BRD7, NKD1</i>
ASD_314	11y	M	ASD	arr[hg19] 17q21.32q21.33(47,245,315-47,450,133)x3	204,818	<i>B4GALNT2, GNGT2, ABI3, PHOSPHO1, FLJ40194, ZNF652</i>

(*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional benign CNV (shown in grey). (2) Patient with an additional clinically relevant CNV (shown in grey). (3) Patient with 2 variants of unknown clinical significance (second hit shown in grey if belongs to a different category). **Abbreviations:** CNVs: y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; ADHD: attention deficit hyperactivity disorder; mat: maternally inherited; pat: paternally inherited; dn: *de novo*; bp: base pairs.

Table V: Benign CNVs sorted by chromosome.

Sample	Age (*)	Gender	Phenotype	ISCN	Size (bp)	Genes (**)
ASD_75	9y	M	ASD	arr[hg19] 2q23.2(150,102,302-150,294,929)x1	192,627	<i>LYPD6</i>
ASD_291	NA	M	ASD	arr[hg19] 4q13.3(72,069,407-72,184,556)x3	115,149	<i>SLC4A4</i>
ASD_226	15y	M	ASD	arr[hg19] 9p21.3p21.2(25,481,660-25,684,180)x1	202,520	<i>TUSC1</i>
ASD_13	3y	F	ASD	arr[hg19] 10q23.31(91,568,553-92,036,154)x1	467,601	<i>LINC00865, LINC01375</i>
ASD_246	9y	F	ASD, facial dysmorphic features	arr[hg19] 12q22(95,423,877-95,577,245)x1	153,368	<i>NR2C1, FGD6</i>
ASD_110	5y	M	ASD	arr[hg19] 13q11q12.11(19,451,382-19,595,141)x1	143,759	<i>LOC348021</i>
ASD_222 (1)	5y	M	See Supplemental Data	arr[hg19] 17p13.3(2,534,709-2,766,781)x3 not mat, 18q23(76,772,006-77,045,710)x3 not mat	273,704	<i>ATP9B</i>
ASD_206	9y	M	ASD, mild ID, epilepsy	arr[hg19] Xp22.12(19,517,225-19,674,965)x2	157,740	<i>MAP3K15, SH3KBP1</i>
ASD_72	13y	M	ASD	arr[hg19] Xq22.1(98,706,558-98,860,140)x0	153,582	<i>LOC442459</i>
ASD_325	5y	M	ASD	arr[hg19] Xq26.1(129,635,358-130,074,967)x2	439,609	<i>ENOX2</i>

(*) Age at diagnosis. (**) OMIM genes are shown in bold. (1) Patient with an additional variant of unknown clinical significance (shown in grey). **Abbreviations:** y:years; NA: not available; F: female; M: male; ASD: autism spectrum disorder; ID: intellectual disability; mat: maternally inherited; bp: base pairs.



REFERENCES

- Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. 2010. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nature protocols* **5**(9): 1564-1573.
- APA. 2000. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision*. American Psychiatric Association, Washington DC.
- . 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed*. American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- Awadalla P, Gauthier J, Myers RA, Casals F, Hamdan FF, Griffing AR, Cote M, Henrion E, Spiegelman D, Tarabeux J et al. 2010. Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am J Hum Genet* **87**(3): 316-324.
- Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, Filippi T, Carey JC. 2013. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol* **17**(6): 589-599.
- Betancur C. 2011. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* **1380**: 42-77.
- Bremer A, Giacobini M, Eriksson M, Gustavsson P, Nordin V, Fernell E, Gillberg C, Nordgren A, Uppstromer A, Anderlid BM et al. 2011. Copy number variation characteristics in subpopulations of patients with autism spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156**(2): 115-124.
- Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Lehner T, Roeder K, State MW, Autism Sequencing C. 2012. The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron* **76**(6): 1052-1056.
- Campbell IM, Gambin T, Dittwald P, Beck CR, Shuvarikov A, Hixson P, Patel A, Gambin A, Shaw CA, Rosenfeld JA et al. 2014. Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination. *BMC biology* **12**: 74.
- Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrao J, Jardim A, Mascarenhas A, Pinto M, Lavoura N, Pais C et al. 2015. Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* **8**: 103.
- Chahrour MH, Yu TW, Lim ET, Ataman B, Coulter ME, Hill RS, Stevens CR, Schubert CR, Collaboration AAS, Greenberg ME et al. 2012. Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS Genet* **8**(4): e1002635.
- Chen L, Zhou W, Zhang L, Zhang F. 2014. Genome architecture and its roles in human copy number variation. *Genomics & informatics* **12**(4): 136-144.
- Christensen DL, Baio J, Braun KV, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M et al. 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* **65**(3): 1-23.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**(7526): 209-215.

- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcin C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C et al. 2012. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* **5**(3): 160-179.
- Gazzellone MJ, Zhou X, Lionel AC, Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Liang S, Sun C, Wang J, Zou M, Tammimies K et al. 2014. Copy number variation in Han Chinese individuals with autism spectrum disorder. *J Neurodev Disord* **6**(1): 34.
- Geschwind DH. 2011. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in cognitive sciences* **15**(9): 409-416.
- Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, Zeijlon L. 2006. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* **36**(3): 429-435.
- Girirajan S, Dennis MY, Baker C, Malig M, Coe BP, Campbell CD, Mark K, Vu TH, Alkan C, Cheng Z et al. 2013a. Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **92**(2): 221-237.
- Girirajan S, Johnson RL, Tassone F, Balciuniene J, Katiyar N, Fox K, Baker C, Srikanth A, Yeoh KH, Khoo SJ et al. 2013b. Global increases in both common and rare copy number load associated with autism. *Hum Mol Genet* **22**(14): 2870-2880.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C et al. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* **42**(3): 203-209.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP et al. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**(7246): 569-573.
- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K et al. 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* **68**(11): 1095-1102.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. 2013. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* **84**(5): 415-421.
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE et al. 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**(7526): 216-221.
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A et al. 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **74**(2): 285-299.
- Itsara A, Wu H, Smith JD, Nickerson DA, Romieu I, London SJ, Eichler EE. 2010. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res* **20**(11): 1469-1481.
- Jiang YH, Yuen RK, Jin X, Wang M, Chen N, Wu X, Ju J, Mei J, Shi Y, He M et al. 2013. Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* **93**(2): 249-263.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance C. 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* **13**(7): 680-685.

- Kirov G, Rees E, Walters JT, Escott-Price V, Georgieva L, Richards AL, Chambert KD, Davies G, Legge SE, Moran JL et al. 2013. The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay. *Biol Psychiatry*.
- Krumm N, O'Roak BJ, Karakoc E, Mohajeri K, Nelson B, Vives L, Jacquemont S, Munson J, Bernier R, Eichler EE. 2013. Transmission disequilibrium of small CNVs in simplex autism. *Am J Hum Genet* **93**(4): 595-606.
- Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, Raja A, Coe BP, Stessman HA, He ZX et al. 2015. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nat Genet* **47**(6): 582-588.
- Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K et al. 2011. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* **70**(5): 886-897.
- Lim ET, Raychaudhuri S, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, MacArthur DG, Neale BM, Kirby A, Ruderfer DM, Fromer M et al. 2013. Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders. *Neuron* **77**(2): 235-242.
- Malhotra D, Sebat J. 2012. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* **148**(6): 1223-1241.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y et al. 2008. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **82**(2): 477-488.
- Matsunami N, Hadley D, Hensel CH, Christensen GB, Kim C, Frackelton E, Thomas K, da Silva RP, Stevens J, Baird L et al. 2013. Identification of rare recurrent copy number variants in high-risk autism families and their prevalence in a large ASD population. *PLoS One* **8**(1): e52239.
- Menashe I, Larsen EC, Banerjee-Basu S. 2013. Prioritization of Copy Number Variation Loci Associated with Autism from AutDB-An Integrative Multi-Study Genetic Database. *PLoS One* **8**(6): e66707.
- Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, Zheng H, Malhotra D, Jin X, Jian M, Liu G, Greer D, Bhandari A et al. 2012. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell* **151**(7): 1431-1442.
- Miles JH. 2011. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet Med* **13**(4): 278-294.
- Molin AM, Andrieux J, Koolen DA, Malan V, Carella M, Colleaux L, Cormier-Daire V, David A, de Leeuw N, Delobel B et al. 2012. A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. *J Med Genet* **49**(2): 104-109.
- Nava C, Keren B, Mignot C, Rastetter A, Chantot-Bastaraud S, Faudet A, Fonteneau E, Amiet C, Laurent C, Jacqueline A et al. 2014. Prospective diagnostic analysis of copy number variants using SNP microarrays in individuals with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **22**(1): 71-78.
- Nava C, Lamari F, Heron D, Mignot C, Rastetter A, Keren B, Cohen D, Faudet A, Bouteiller D, Gilleron M et al. 2012. Analysis of the chromosome X exome in patients with autism spectrum disorders identified novel candidate genes, including TMLHE. *Translational psychiatry* **2**: e179.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V et al. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**(7397): 242-245.

- O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, Karakoc E, Mackenzie AP, Ng SB, Baker C et al. 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* **43**(6): 585-589.
- O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K et al. 2012a. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* **338**(6114): 1619-1622.
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD et al. 2012b. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**(7397): 246-250.
- Oikonomakis V, Kosma K, Mitrakos A, Sofocleous C, Pervanidou P, Syrmou A, Pampanos A, Psoni S, Fryssira H, Kanavakis E et al. 2016. Recurrent copy number variations as risk factors for Autism Spectrum Disorders: analysis of the clinical implications. *Clin Genet*.
- Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K et al. 2011. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics* **128**(3): e488-495.
- Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, Mullan G, Turner G, Einfeld S, Tonge B, Mowat D. 2013. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A*.
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z et al. 2014. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **94**(5): 677-694.
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS et al. 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**(7304): 368-372.
- Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, Kou Y, Harony-Nicolas H, Kajiwarra Y, De Rubeis S, Durand S, Stevens C, Rehnstrom K et al. 2013. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **93**(4): 607-619.
- Prasad A, Merico D, Thiruvahindrapuram B, Wei J, Lionel AC, Sato D, Rickaby J, Lu C, Szatmari P, Roberts W et al. 2012. A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. *G3 (Bethesda)* **2**(12): 1665-1685.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. 2006. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* **38**(8): 904-909.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ et al. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* **81**(3): 559-575.
- Quintela I, Fernandez-Prieto M, Gomez-Guerrero L, Resches M, Eiris J, Barros F, Carracedo A. 2015a. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain. *Clinical case reports* **3**(6): 415-423.
- Quintela I, Gomez-Guerrero L, Fernandez-Prieto M, Resches M, Barros F, Carracedo A. 2015b. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and co-morbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion. *Am J Med Genet A* **167**(12): 3121-3129.

- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. 2014. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* **535**(1): 70-78.
- Ronald A, Hoekstra RA. 2011. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156B**(3): 255-274.
- Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. 2012. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med*.
- Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA et al. 2011. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* **70**(5): 863-885.
- Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* **87**(6): 1215-1233.
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, DiLullo NM, Parikshak NN, Stein JL et al. 2012. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**(7397): 237-241.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J et al. 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* **316**(5823): 445-449.
- Shi L, Zhang X, Golhar R, Otieno FG, He M, Hou C, Kim C, Keating B, Lyon GJ, Wang K et al. 2013. Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Molecular autism* **4**(1): 8.
- Shuvarikov A, Campbell IM, Dittwald P, Neill NJ, Bialer MG, Moore C, Wheeler PG, Wallace SE, Hannibal MC, Murray MF et al. 2013. Recurrent HERV-H-mediated 3q13.2-q13.31 deletions cause a syndrome of hypotonia and motor, language, and cognitive delays. *Hum Mutat* **34**(10): 1415-1423.
- Spielmann M, Klopocki E. 2013. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Curr Opin Genet Dev* **23**(3): 249-256.
- Toma C, Torrico B, Hervas A, Valdes-Mas R, Tristan-Noguero A, Padillo V, Maristany M, Salgado M, Arenas C, Puente XS et al. 2013. Exome sequencing in multiplex autism families suggests a major role for heterozygous truncating mutations. *Mol Psychiatry*.
- Turner TN, Hormozdiari F, Duyzend MH, McClymont SA, Hook PW, Iossifov I, Raja A, Baker C, Hoekzema K, Stessman HA et al. 2016. Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA. *Am J Hum Genet* **98**(1): 58-74.
- Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Walker S, Wang Z, Hu P, Lamoureux S, Wei J, MacDonald JR, Pellecchia G, Lu C et al. 2015. A high-resolution copy-number variation resource for clinical and population genetics. *Genet Med* **17**(9): 747-752.
- Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW, Schuurs-Hoeijmakers JH, Meader S, Hellebrekers CJ, Thoonen IJ, de Brouwer AP, Brunner HG, Webber C et al. 2013. Clinical Significance of De Novo and Inherited Copy-Number Variation. *Hum Mutat*.
- Walker S, Scherer SW. 2013. Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. *BMC Genomics* **14**: 499.
- Wisniewiecka-Kowalnik B, Kastory-Bronowska M, Bartnik M, Derwinska K, Dymczak-Domini W, Szumbaraska D, Ziemka E, Szczaluba K, Sykulski M, Gambin T et al. 2013. Application of

custom-designed oligonucleotide array CGH in 145 patients with autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **21**(6): 620-625.

Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, Schmitz-Abe K, Harmin DA, Adli M, Malik AN et al. 2013. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* **77**(2): 259-273.

Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y et al. 2015. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature medicine* **21**(2): 185-191.



SUPPLEMENTAL DATA

Patient with clinically relevant CNVs

Patient ASD_229 arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3,2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1 (Figures S1a and S1b)

Patient ASD_221 arr[hg19] 2p16.3(51,027,613-51,161,647)x1 (Figure S1b)

Patient ASD_229 is a 5-year-old female with a clinical diagnosis of autism spectrum disorder (ASD). Microarray-based copy number analysis revealed two rare exonic heterozygous CNVs in her genome: a copy number gain of unknown clinical significance involving 11 genes (*XDH*, *SRD5A2*, *MEMO1*, *DPY30*, *SPAST*, *SLC30A6*, *NLRC4*, *YIPF4*, *BIRC6*, *MIR558*, and *TTC27*) and a copy number loss deleting two exons of the *NRXN1* gene (MIM 600565) (Fig. S1a and S1b). Patient ASD_221 is a 15-year-old male with ASD (Asperger syndrome, according to previous versions of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. His family medical history includes a maternal uncle with psychiatric disorders and a mother with a history of learning difficulties, attention deficit and social interaction problems), who carried a deletion at chromosome 2p16.3, also involving *NRXN1* (Fig. S1b). The neurexins (NRXN) are a group of pre-synaptic cell adhesion proteins implicated in synaptic activity, that are encoded by three highly conserved genes: *NRXN1*, *NRXN2* and *NRXN3*. Heterozygous exonic copy number losses, as well as other mutations or structural variations, disrupting the *NRXN1* gene have been found in patients with a wide spectrum of neurodevelopmental and psychiatric conditions, including ASD, intellectual disability (ID), abnormal behaviors, anxiety, bipolar disorder, depression and/or schizophrenia (Wisniewicka-Kowalnik et al. 2010; Gregor et al. 2011; Soysal et al. 2011; Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Imitola et al. 2014; Roberts et al. 2014; Vinas-Jornet et al. 2014; Agha et al. 2015; Lowther et al. 2016; Oikonomakis et al. 2016). Muscular hypotonia and epilepsy are also common features (Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Lowther et al. 2016), while facial dysmorphism and congenital malformations were infrequently or inconsistently found among these patients (Schaaf et al. 2012; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016). Besides the evident clinical heterogeneity, the identification of *NRXN1* deletions in control population and in mildly affected or asymptomatic carrier parents and siblings (Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016) suggests incomplete penetrance, which may be explained by the action of genetic, environmental, and/or stochastic factors. In that sense, a subset of patients with *NRXN1* deletions in the literature was found to carry additional pathogenic or uncertain CNVs (Soysal et al. 2011; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016), as is the case of our Patient ASD_229, who also presented a copy number gain at chromosome 2p23.1p22.3 (Fig S1a). The clinical significance of this second variant is unclear, but it may act as a potential phenotype modifier, as suggested by the multiple-hit model of neurodevelopmental disorders (Girirajan et al. 2010). Additionally, and reinforcing the recent hypothesis that supports a higher penetrance of 5' *NRXN1* losses over 3' *NRXN1* losses (Lowther et al. 2016), the aberrations identified in our study affected the 5' end of the gene. According to Lowther et al. [2016], a plausible explanation may be the action of the non-

coding mRNA AK127244, located upstream of the *NRXN1* gene and found deleted in patients with neurodevelopmental (borderline ID, ASD) and psychiatric disorders (early-onset schizophrenia) (Walker and Scherer 2013; Duong et al. 2015), as is the case of our sample ASD_229. In summary, the findings in our two patients further support the role of *NRXN1* haploinsufficiency in ASD, highlight the fact that the concomitant presence of multiple variants in a genome may act modifying phenotypic expression and support the hypothesis of the relevance of 5' exons of this gene and AK127244 in neurodevelopment.

Patients with likely pathogenic CNVs

Patient ASD_300 arr[hg19] 8p21.3(19,194,170-21,760,673)x1 (Figure S2)

Patient ASD_300 is a 7-year-old male with a clinical diagnosis of ASD, who presented a 2.6 Mb copy number loss at chromosome 8p21.3, encompassing the following genes: *SH2D4A*, *CSGALNACT1*, *INTS10*, *LPL*, *SLC18A1*, *ATP6V1B2*, *LZTS1*, *LOC286114* and *GFRA2* (Fig S2). Several lines of evidence prompted us to consider this CNV as likely pathogenic. First, the expression pattern of *Lzts1* (leucine zipper, putative tumor suppressor 1) in mouse and chicken embryos suggested a role in neuronal development, with potential functions in cell cycle regulation, axon growth or guidance, and/or neuronal migration (Kropp and Wilson 2012). Second, a recurrent *de novo* missense single nucleotide variant (SNV) in *ATP6V1B2* (ATPase, H⁺ transporting, lysosomal, 56/58-KD, V1 subunit B, isoform 2; OMIM 606939) was recently found in patients with Zimmermann-Laband 2 syndrome (Kortum et al. 2015), a developmental disorder presented with a variable phenotype, mainly characterized by ID, facial dysmorphism, hypoplasia or aplasia of nails and terminal phalanges, and hypertrichosis (OMIM 616455). Third, several linkage analysis and case-control association studies have implicated *SLC18A1* (solute carrier family 18 member A1) -encoding one of the transporters responsible of the presynaptic vesicular packaging of monoamine neurotransmitters (Wimalasena 2011)- in a wide range of psychiatric disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, anorexia nervosa or obsessive compulsive disorder (OCD) (Bly 2005; Chen et al. 2007; Lohoff et al. 2008; Tabares-Seisdedos and Rubenstein 2009; Lohoff 2010; Mas et al. 2013). Additionally, Ortiz et al. (2015) found a significant association between the concentration of glutamatergic compounds in the anterior cingulate cortex and the polymorphism rs6586896, located within the *SLC18A1* gene, in pediatric patients with OCD (Ortiz et al. 2015). Although we considered the deletion detected in our patient as likely pathogenic on the basis of its length, gene content and these findings in the literature, further studies and clinical descriptions are needed to definitively associate this genetic variant with our patient's phenotype.

Patient ASD_222 arr[hg19] 17p13.3(2,534,709-2,766,781)x3 not mat,18q23(76,772,006-77,045,710)x3 not mat (Figure S3)

Patient ASD_222 is a 5-year-old male with a clinical diagnosis of ASD who presented two rare exonic heterozygous CNVs in his genome: a 232.1 kb copy number gain at chromosome 17p13.3, with distal and proximal breakpoints disrupting *PAFAH1B1* and *RAP1GAP2*, respectively (Fig. S3) and a 273.7 kb gain affecting the *ATP9B* gene. Haploinsufficiency of *PAFAH1B1* (also known as *LIS1*; platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit; OMIM 601545) is known to cause lissencephaly-1 (OMIM 607432), a medical

condition manifested as part of the Miller-Dieker syndrome (MDS), with severe to profound ID, or as isolated lissencephaly, depending on the deletion size and the gene content (Mei et al. 2008; Haverfield et al. 2009; Bruno et al. 2010). Microduplications in *PAFAH1B1* have also been described in patients with a broad spectrum of clinical manifestations, including mild to severe developmental delay and/or ID, autism, behavior problems, hypotonia, and facial dysmorphism. These chromosomal alterations are non recurrent and variable in size and, in consequence, can affect multiple genes (Bi et al. 2009; Roos et al. 2009; Bruno et al. 2010; Hyon et al. 2011; Classen et al. 2013); nevertheless, duplications including only the *PAFAH1B1* gene (Bi et al. 2009; Faletra et al. 2011) and intragenic copy number gains within this gene (Mei et al. 2008; Haverfield et al. 2009; Lockrow et al. 2012; Takahashi et al. 2015) have also been identified. Our patient presents ASD, a phenotypic manifestation described both in patients with multigenic duplications including *PAFAH1B1* (Bi et al. 2009; Bruno et al. 2010), and in the patient studied by Faletra et al. (2011), a 6 year-old female with ASD, ID, expressive language delay and facial dysmorphism and a monogenic *PAFAH1B1* microduplication (Faletra et al. 2011). These findings suggest that the 17p13.3 copy number gain detected in our patient could be clinically relevant due to the *PAFAH1B1* disruption. However, additional factors, such as a potential contribution of the *RAP1GAP2* gene (disrupted at the proximal breakpoint of the 17p13.3 gain) and/or the 18q23 CNV (considered a benign variant) cannot be ruled out.





SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1a. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_229 [hg19].

Figure S1b. Microarray-based copy number variation analysis in Patients ASD_229 and ASD_221 [hg19].

Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_300 [hg19].

Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_222 [hg19].





Figure S1a. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_229 [hg19].

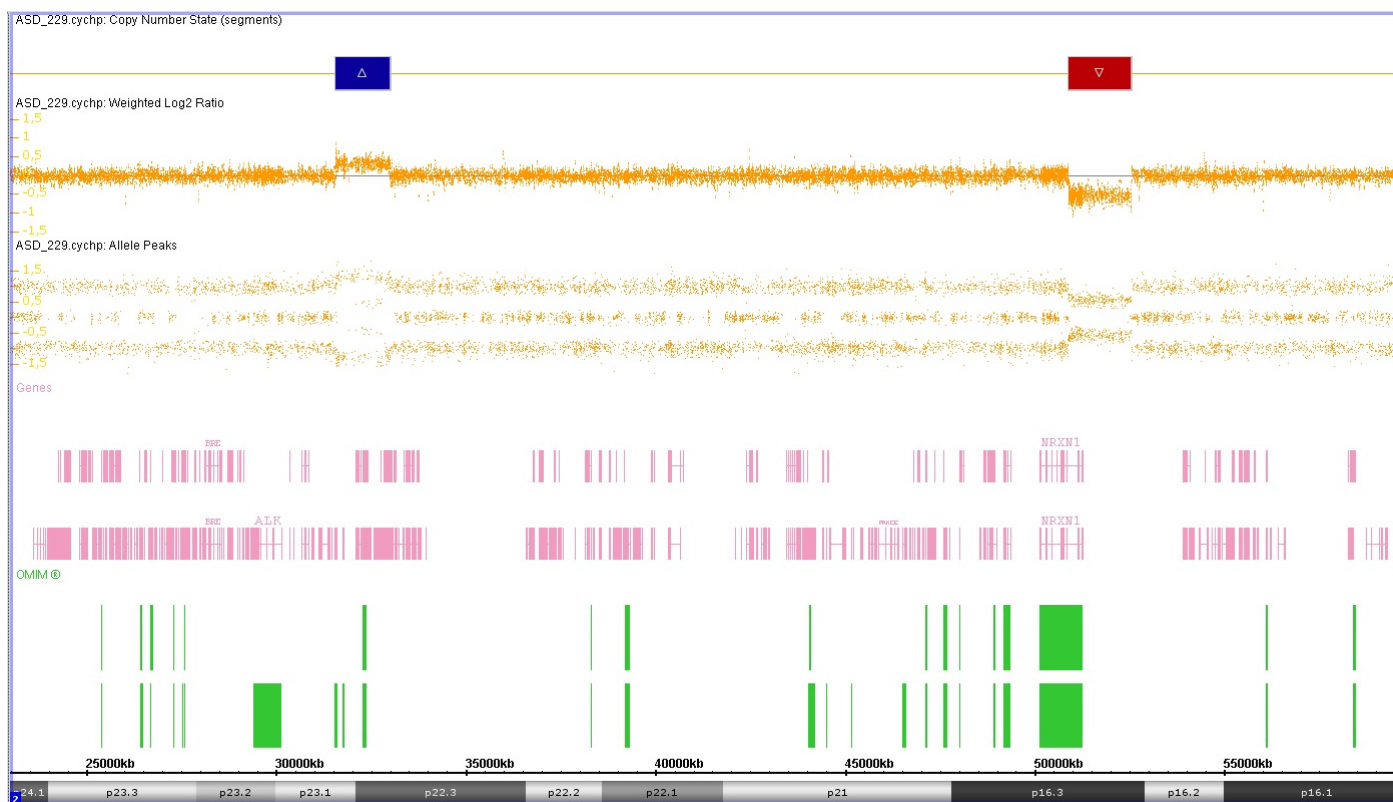


Figure S1a. Microarray-based copy number variation analysis in Patients ASD_229, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 1.4 Mb copy number gain at chromosome 2p23.1p22.3 and the 1.7 deletion at chromosome 2p16.3, both detected in Patient ASD_229 (arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3,2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1).

Figure S1b. Microarray-based copy number variation analysis in Patients ASD_229 and ASD_221 [hg19].

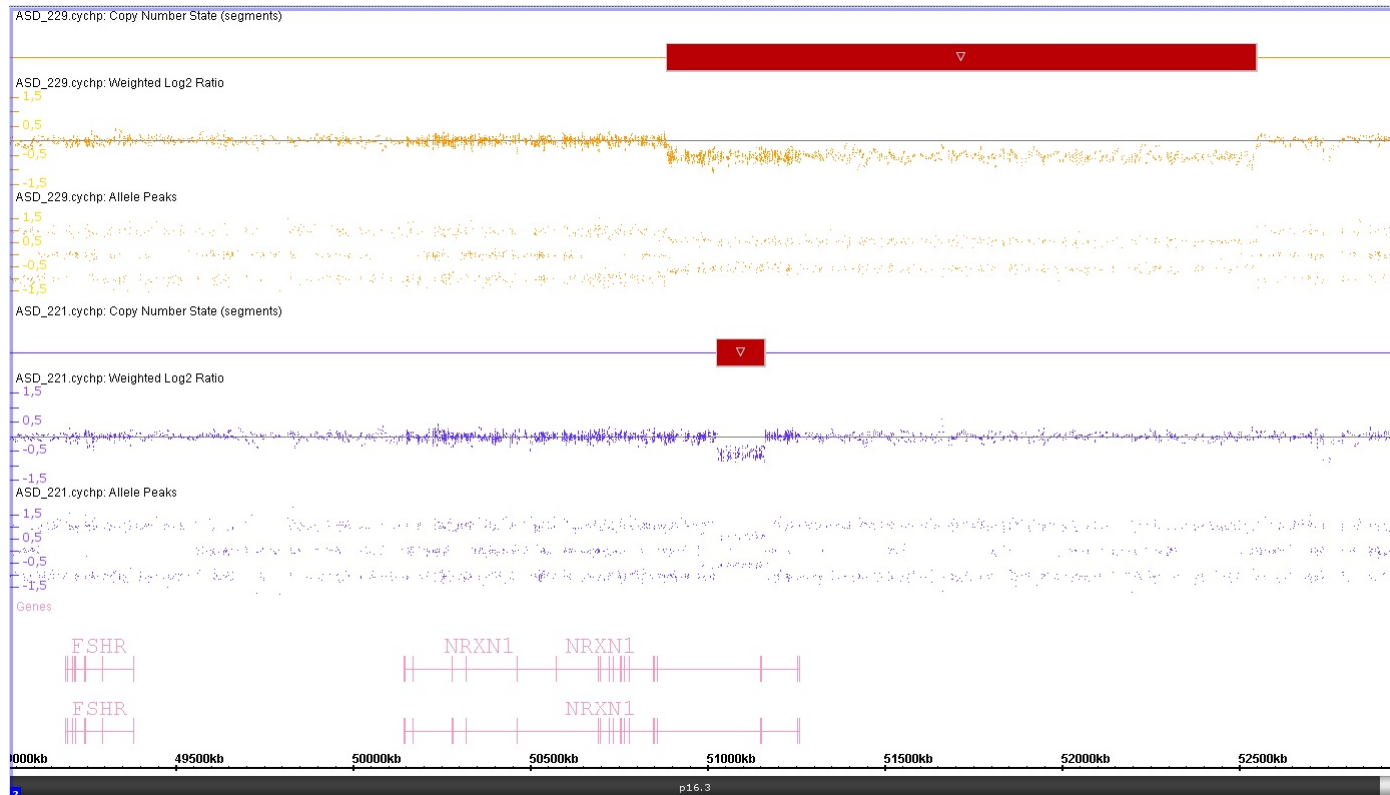


Figure S1b. Microarray-based copy number variation analysis in Patients ASD_229 and ASD_221, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 2p16.3 region showing the SNP array results in Patients ASD_229 (arr[hg19] 2p23.1p22.3(31,565,860-33,000,665)x3,2p16.3(50,888,428-52,549,542)x1) and ASD_221 (arr[hg19] 2p16.3(51,027,613-51,161,647)x1), both carrying exonic deletions affecting the *NRXN1* gene (MIM 600565).

Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_300 [hg19].

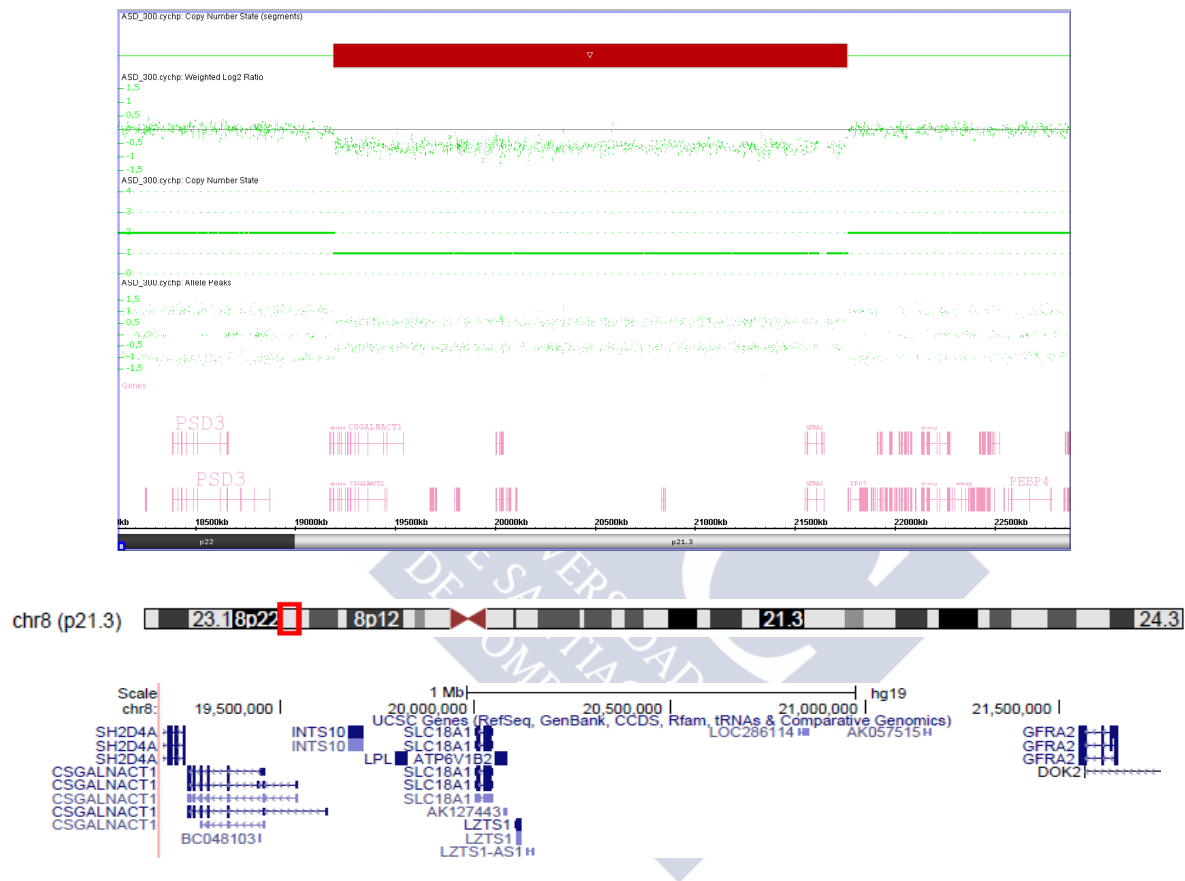


Figure S2. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_300, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 2.6 Mb copy number loss at chromosome 8p21.3 (arr[hg19] 8p21.3(19,194,170-21,760,673)x1) in Patient ASD_300 and the deleted genes, as plotted in the UCSC Genome Browser [hg 19].

Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_222 [hg19].

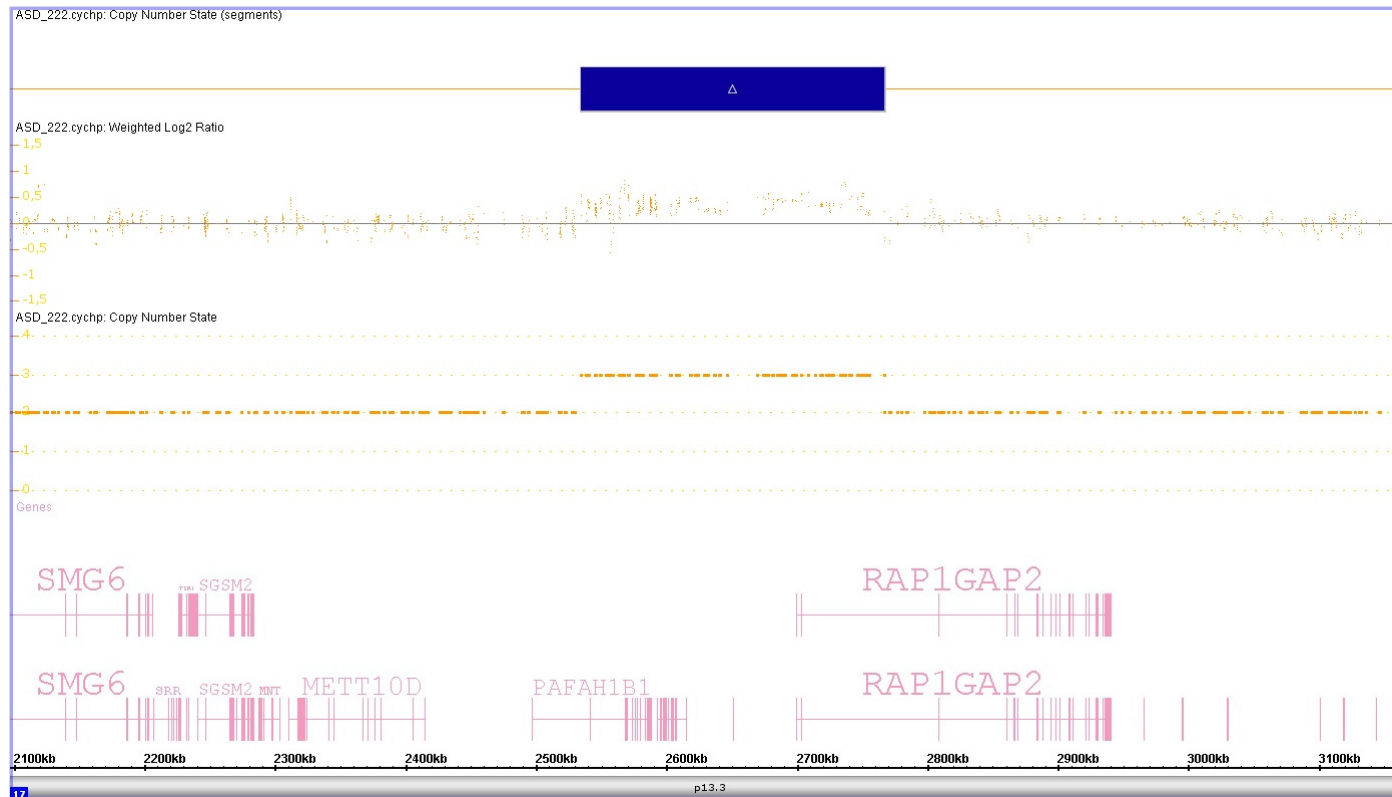


Figure S3. Microarray-based copy number variation analysis in Patient ASD_222, performed with the Affymetrix CytoScan High Density array and visualized using the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. Image of the 232.1 kb copy number gain at chromosome 17p13.3 in Patient ASD_222 (arr[hg19] 17p13.3(2,534,709-2,766,781)x3 not mat,18q23(76,772,006-77,045,710)x3 not mat).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Agha Z, Iqbal Z, Kleefstra T, Zweier C, Pfundt R, Qamar R, H VANB, Willemsen MH. 2015. A de novo microdeletion in NRXN1 in a Dutch patient with mild intellectual disability, microcephaly and gonadal dysgenesis. *Genetics research* **97**: e19.
- Bena F, Bruno DL, Eriksson M, van Ravenswaaij-Arts C, Stark Z, Dijkhuizen T, Gerkes E, Gimelli S, Ganesamoorthy D, Thuresson AC et al. 2013. Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **162B**(4): 388-403.
- Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL et al. 2009. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat Genet* **41**(2): 168-177.
- Bly M. 2005. Mutation in the vesicular monoamine gene, SLC18A1, associated with schizophrenia. *Schizophr Res* **78**(2-3): 337-338.
- Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP et al. 2010. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet* **47**(5): 299-311.
- Classen S, Goecke T, Drechsler M, Betz B, Nickel N, Beier M, Schaper J, Karenfort M, Royer-Pokora B. 2013. A novel inverted 17p13.3 microduplication disrupting PAFAH1B1 (LIS1) in a girl with syndromic lissencephaly. *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1453-1458.
- Curran S, Ahn JW, Grayton H, Collier DA, Ogilvie CM. 2013. NRXN1 deletions identified by array comparative genome hybridisation in a clinical case series - further understanding of the relevance of NRXN1 to neurodevelopmental disorders. *Journal of molecular psychiatry* **1**(1): 4.
- Chen SF, Chen CH, Chen JY, Wang YC, Lai IC, Liou YJ, Liao DL. 2007. Support for association of the A277C single nucleotide polymorphism in human vesicular monoamine transporter 1 gene with schizophrenia. *Schizophr Res* **90**(1-3): 363-365.
- Dabell MP, Rosenfeld JA, Bader P, Escobar LF, El-Khechen D, Vallee SE, Dinulos MB, Curry C, Fisher J, Tervo R et al. 2013. Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet A* **161A**(4): 717-731.
- Duong LT, Hoeffding LK, Petersen KB, Knudsen CD, Thygesen JH, Klitten LL, Tommerup N, Ingason A, Werge T. 2015. Two rare deletions upstream of the NRXN1 gene (2p16.3) affecting the non-coding mRNA AK127244 segregate with diverse psychopathological phenotypes in a family. *Eur J Med Genet* **58**(12): 650-653.
- Falettra F, Devescovi R, Pecile V, Fabretto A, Carrozzi M, Gasparini P. 2011. A new case of duplication of the MDS region identified by high-density SNP arrays and a review of the literature. *J Appl Genet* **52**(1): 77-80.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C et al. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* **42**(3): 203-209.
- Gregor A, Albrecht B, Bader I, Bijlsma EK, Ekici AB, Engels H, Hackmann K, Horn D, Hoyer J, Klapceki J et al. 2011. Expanding the clinical spectrum associated with defects in CNTNAP2 and NRXN1. *BMC Med Genet* **12**: 106.
- Haverfield EV, Whited AJ, Petras KS, Dobyns WB, Das S. 2009. Intragenic deletions and duplications of the LIS1 and DCX genes: a major disease-causing mechanism in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* **17**(7): 911-918.
- Hyon C, Marlin S, Chantot-Bastarud S, Mabboux P, Beaujard MP, Al Ageeli E, Vazquez MP, Picard A, Siffroi JP, Portnoi MF. 2011. A new 17p13.3 microduplication including the PAFAH1B1 and YWHAE genes resulting from an unbalanced X;17 translocation. *Eur J Med Genet* **54**(3): 287-291.

- Imitola J, Walleigh D, Anderson CE, Jethva R, Carvalho KS, Legido A, Khurana DS. 2014. Fraternal twins with autism, severe cognitive deficit, and epilepsy: diagnostic role of chromosomal microarray analysis. *Seminars in pediatric neurology* **21**(2): 167-171.
- Kortum F, Caputo V, Bauer CK, Stella L, Ciolfi A, Alawi M, Bocchinfuso G, Flex E, Paolacci S, Dentici ML et al. 2015. Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* **47**(6): 661-667.
- Kropp M, Wilson SI. 2012. The expression profile of the tumor suppressor gene *Lzts1* suggests a role in neuronal development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **241**(5): 984-994.
- Lockrow JP, Holden KR, Dwivedi A, Matheus MG, Lyons MJ. 2012. LIS1 duplication: expanding the phenotype. *Journal of child neurology* **27**(6): 791-795.
- Lohoff FW. 2010. Genetic variants in the vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1/SLC18A1) and neuropsychiatric disorders. *Methods Mol Biol* **637**: 165-180.
- Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Buono RJ, Doyle GA, Ferraro TN, Berrettini WH. 2008. Association between polymorphisms in the vesicular monoamine transporter 1 gene (VMAT1/SLC18A1) on chromosome 8p and schizophrenia. *Neuropsychobiology* **57**(1-2): 55-60.
- Lowther C, Speevak M, Armour CM, Goh ES, Graham GE, Li C, Zeesman S, Nowaczyk MJ, Schultz LA, Morra A et al. 2016. Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genet Med*.
- Mas S, Plana MT, Castro-Fornieles J, Gasso P, Lafuente A, Moreno E, Martinez E, Mila M, Lazaro L. 2013. Common genetic background in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder: preliminary results from an association study. *J Psychiatr Res* **47**(6): 747-754.
- Mei D, Lewis R, Parrini E, Lazarou LP, Marini C, Pilz DT, Guerrini R. 2008. High frequency of genomic deletions--and a duplication--in the LIS1 gene in lissencephaly: implications for molecular diagnosis. *J Med Genet* **45**(6): 355-361.
- Oikonomakis V, Kosma K, Mitrakos A, Sofocleous C, Pervanidou P, Syrmou A, Pampanos A, Psoni S, Fryssira H, Kanavakis E et al. 2016. Recurrent copy number variations as risk factors for Autism Spectrum Disorders: analysis of the clinical implications. *Clin Genet*.
- Ortiz AE, Gasso P, Mas S, Falcon C, Bargallo N, Lafuente A, Lazaro L. 2015. Association between genetic variants of serotonergic and glutamatergic pathways and the concentration of neurometabolites of the anterior cingulate cortex in paediatric patients with obsessive-compulsive disorder. *World J Biol Psychiatry*: 1-11.
- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. 2014. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* **535**(1): 70-78.
- Roos L, Jonch AE, Kjaergaard S, Taudorf K, Simonsen H, Hamborg-Petersen B, Brondum-Nielsen K, Kirchoff M. 2009. A new microduplication syndrome encompassing the region of the Miller-Dieker (17p13 deletion) syndrome. *J Med Genet* **46**(10): 703-710.
- Schaaf CP, Boone PM, Sampath S, Williams C, Bader PI, Mueller JM, Shchelochkov OA, Brown CW, Crawford HP, Phalen JA et al. 2012. Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. *Eur J Hum Genet* **20**(12): 1240-1247.
- Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, Hekimler K, Imirzalioglu N. 2011. A 10.46 Mb 12p11.1-12.1 interstitial deletion coincident with a 0.19 Mb NRXN1 deletion detected by array CGH in a girl with scoliosis and autism. *Am J Med Genet A* **155A**(7): 1745-1752.
- Tabares-Seisdedos R, Rubenstein JL. 2009. Chromosome 8p as a potential hub for developmental neuropsychiatric disorders: implications for schizophrenia, autism and cancer. *Mol Psychiatry* **14**(6): 563-589.
- Takahashi S, Tanaka R, Okano S, Okayama A, Suzuki N, Azuma H. 2015. Characterization of intragenic tandem duplication in the PAFAH1B1 gene leading to isolated lissencephaly sequence. *Mol Cytogenet* **8**: 84.

- Vinas-Jornet M, Esteba-Castillo S, Gabau E, Ribas-Vidal N, Baena N, San J, Ruiz A, Coll MD, Novell R, Guitart M. 2014. A common cognitive, psychiatric, and dysmorphic phenotype in carriers of NRXN1 deletion. *Molecular genetics & genomic medicine* **2**(6): 512-521.
- Walker S, Scherer SW. 2013. Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. *BMC Genomics* **14**: 499.
- Wimalasena K. 2011. Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Medicinal research reviews* **31**(4): 483-519.
- Wisniewiecka-Kowalnik B, Nesteruk M, Peters SU, Xia Z, Cooper ML, Savage S, Amato RS, Bader P, Browning MF, Haun CL et al. 2010. Intragenic rearrangements in NRXN1 in three families with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(5): 983-993.





ARTÍCULO VIII. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and comorbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion

AUTORES

Inés Quintela, Lorena Gómez-Guerrero, Montse Fernández-Prieto, Mariela Resches, Francisco Barros, Ángel Carracedo.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Am J Med Genet A. 2015 Dec;167(12):3121-9.

DOI

10.1002/ajmg.a.37292.

RESUMEN

In recent years, the advent of comparative genomic hybridization (CGH) and single nucleotide polymorphism (SNP) arrays and its use as a first genetic test for the diagnosis of patients with neurodevelopmental phenotypes has allowed the identification of novel submicroscopic chromosomal abnormalities (namely, copy number variants or CNVs), imperceptible by conventional cytogenetic techniques. The 3q13.31 microdeletion syndrome (OMIM #615433) has been defined as a genomic disorder mainly characterized by developmental delay, postnatal overgrowth, hypotonia, genital abnormalities in males, and characteristic craniofacial features. Although the 3q13.31 CNVs are variable in size, a 3.4 Mb recurrently altered region at 3q13.2–q13.31 has been recently described and non-allelic homologous recombination (NAHR) mediated by flanking human endogenous retrovirus (HERV-H) elements has been suggested as the mechanism of deletion formation. We expand the phenotypic spectrum associated with this recurrent deletion performing the clinical description of a 9-year-old female patient with autistic disorder, total absence of language, intellectual disability, anxiety disorder and disruptive, and compulsive eating behaviors. The array-based molecular karyotyping allowed the identification of a de novo recurrent 3q13.2–q13.31 deletion encompassing 25 genes. In addition, we compare her clinical phenotype with previous reports of patients with neurodevelopmental and behavioral disorders and proximal 3q microdeletions. Finally, we also review the candidate genes proposed so far for these phenotypes.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fajmg.a.37292>





ARTÍCULO IX. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain

AUTORES

Inés Quintela, Montse Fernández-Prieto, Lorena Gómez-Guerrero, Mariela Resches, Jesús Eirís, Francisco Barros, Ángel Carracedo.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

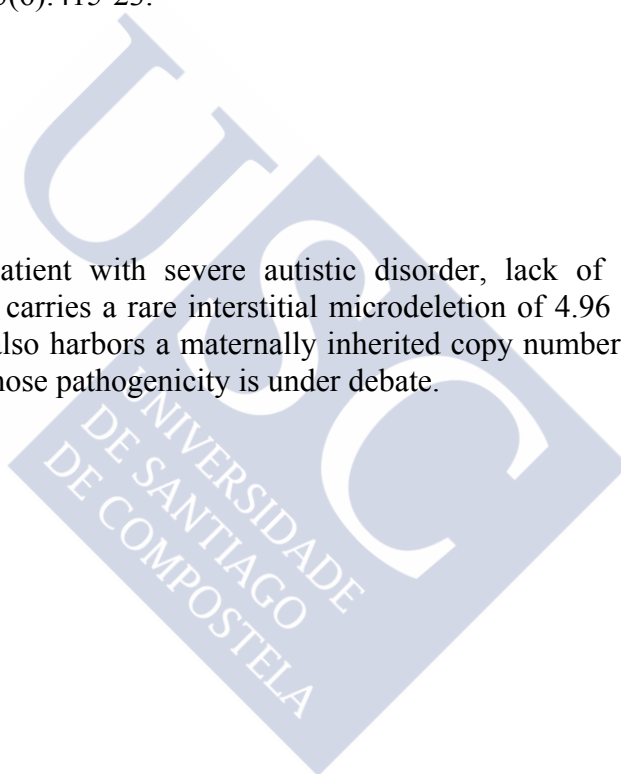
Clin Case Rep. 2015 Jun;3(6):415-23.

DOI

10.1002/ccr3.255.

RESUMEN

We report on a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features who carries a rare interstitial microdeletion of 4.96 Mb at chromosome 6q14.1-q15. The patient also harbors a maternally inherited copy number gain of 1.69 Mb at chromosome Xp22.31, whose pathogenicity is under debate.





<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1002%2Fccr3.255>.





ARTÍCULO X. Phenotypic descriptions of two female patients with neurodevelopmental disorders and non-overlapping exonic deletions affecting the *AUTS2* gene: Comparison of their neurocognitive, behavioral and clinical profiles and literature review

AUTORES

Inés Quintela, Francisco Barros, Jesús Eirís, Montse Fernández-Prieto, Lorena Gómez-Guerrero, Mariela Resches, Adriana Sampaio, Ángel Carracedo.

REVISTA Y FECHA DE PUBLICACIÓN

Manuscrito en preparación.

DOI

No disponible.

RESUMEN

The autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) gene has been found to be disrupted in patients with a phenotypic spectrum mainly characterized by intellectual disability or developmental delay, autism spectrum disorder or autistic features, attention deficit hyperactivity disorder and/or sound sensitivity, as well as microcephaly, feeding difficulties and low birth weight, hypotonia and/or epilepsy. These clinical manifestations present a high interindividual variability, with a strong correlation between the severity of the phenotype and the position of the chromosomal aberration within the gene. The precise function of *AUTS2* is largely unknown but it is becoming evident that it is a tightly regulated gene with an important role in neurodevelopment. This report describes and compares the phenotypes of two females patients with exonic deletions in *AUTS2*, who exhibit contrasting neurocognitive, behavioral and clinical profiles. A systematic review of the main genetic and clinical features of the clinical reports previously documented in the literature is also performed. Our findings, along with previous data, demonstrate the complexity of interpreting genomic data and the difficulty of genetic counseling and patient management.



Phenotypic Descriptions of Two Female Patients With Neurodevelopmental Disorders and Non-Overlapping Exonic Deletions Affecting the *AUTS2* Gene: Comparison of Their Neurocognitive, Behavioral and Clinical Profiles and Literature Review

Quintela Inés¹, Barros Francisco², ✉, Eirís Jesús³, Fernández-Prieto Montse², Gómez-Guerrero Lorena², Resches Mariela⁴, Sampaio Adriana⁵, Carracedo Ángel^{1,2,6}

✉ Corresponding author

¹Grupo de Medicina Xenómica, Universidade de Santiago de Compostela, Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos - Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCI). Santiago de Compostela, Spain. ²Grupo de Medicina Xenómica, CIBERER, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica - SERGAS, Santiago de Compostela, Spain. ³Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela - Unidad de Neurología Pediátrica. Departamento de Pediatría. Santiago de Compostela, Spain. ⁴Universidade de Santiago de Compostela - Departamento de Psicología Evolutiva y de la Educación. Santiago de Compostela, Spain. ⁵Neuropsychophysiology Lab, CIPsi, School of Psychology, University of Minho, Braga, Portugal. ⁶King Abdulaziz University, Center of Excellence in Genomic Medicine Research. Jeddah, Saudi Arabia.

CORRESPONDING AUTHOR CONTACT INFORMATION

Francisco Barros, Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica. Edificio Consultas Externas, planta -2. Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela. 15707 Santiago de Compostela, Spain.

KEY WORDS

7q11.22 deletion, copy number variation, deletion, *AUTS2*, intellectual disability, developmental delay, autism spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder.

RUNNING HEADS

Authors: Quintela et al.

Shorter version of the title: Neurodevelopmental Phenotypes and *AUTS2* Exonic Deletions.

ABSTRACT

The autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) gene has been found to be disrupted in patients with a phenotypic spectrum mainly characterized by intellectual disability or developmental delay, autism spectrum disorder or autistic features, attention deficit hyperactivity disorder and/or sound sensitivity, as well as microcephaly, feeding difficulties and low birth weight, hypotonia and/or epilepsy. These clinical manifestations present a high interindividual variability, with a strong correlation between the severity of the phenotype and the position of the chromosomal aberration within the gene. The precise function of *AUTS2* is largely unknown but it is becoming evident that it is a tightly regulated gene with an important role in neurodevelopment. This report describes and compares the phenotypes of two females patients with exonic deletions in *AUTS2*, who exhibit contrasting neurocognitive, behavioral and clinical profiles. A systematic review of the main genetic and clinical features of the clinical reports previously documented in the literature is also performed. Our findings, along with previous data, demonstrate the complexity of interpreting genomic data and the difficulty of genetic counseling and patient management.

ABBREVIATIONS

AUTS2: autism susceptibility candidate 2; OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man; CNV: Copy Number Variation; ID: Intellectual Disability; DD: Developmental Delay; ASD: Autism Spectrum Disorder; ADHD: Attention Deficit Hyperactivity Disorder; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; MRI: Magnetic Resonance Imaging; WISC - IV: Wechsler Intelligence Scale for Children - IV; FSIQ: Full Scale Intelligence Quotient; CBCL: Child Behavior Checklist; SCQ - B: Social Communication Questionnaire - B; VABS - II: Vineland Adaptive Behavior Scales - II; BDI: Battelle Developmental Inventory; PPVT - III: Peabody Picture Vocabulary Test - III; ADOS - G: Autism Diagnostic Observation Schedule - Generic; ADI- R: Autism Diagnostic Interview - Revised; *Tbr1* or *TBR1*: T-box, brain, 1; *Mecp2* or *MECP2*: methyl CpG binding protein 2; *Satb2* or *SATB2*: SATB homeobox 2; *Zmat3* or *ZMAT3*: zinc finger matrin-type 3; *Wig1* or *WIG1*: wildtype p53-induced gene; *Gtf2ird1* or *GTF2IRD1*: GTF2I repeat domain-containing 1; *SEMA5A*: semaphorin 5A; ChIP-seq: chromatin immunoprecipitation followed by sequencing; RNA-seq: RNA sequencing; PRC1: Polycomb complex.

INTRODUCTION

The *AUTS2* (OMIM *607270; autism susceptibility candidate 2) gene maps to chromosome 7q11.22, has a size of 1.2 Mb and 19 exons (Sultana et al. 2002) and is mainly expressed in the brain (Oksenberg and Ahituv 2013). This gene is affected by rare structural variants (chromosomal translocations and inversions and copy number variants or CNVs) in patients with neurodevelopmental disorders (such as intellectual disability (ID)/developmental delay (DD), language and speech impairments (de la Barra et al. 1986; Sultana et al. 2002; Kalscheuer et al. 2007; Bakkaloglu et al. 2008; Ben-David et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Nagamani et al. 2012; Beunders et al. 2013; Jolley et al. 2013; Tropeano et al. 2013; Amarillo et al. 2014; Beunders et al. 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015; Schneider et al. 2015), autism spectrum disorder (ASD)/autistic features (de la Barra et al. 1986; Sultana et al. 2002; Bakkaloglu et al. 2008; Glessner et al. 2009; Huang et al. 2010; Ben-David et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Nagamani et al. 2012; Talkowski et al. 2012; Beunders et al. 2013; Beunders et al. 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015; Schneider et al. 2015) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)/hyperactivity (Elia et al. 2010; Williams et al. 2010; Beunders et al. 2013; Beunders et al. 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015; Schneider et al. 2015)) and neurological problems (including epilepsy (de la Barra et al. 1986; Sultana et al. 2002; Kalscheuer et al. 2007; Mefford et al. 2010; Ben-David et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Fan et al. 2015)). In addition, *AUTS2* has been proposed as a susceptibility gene for psychiatric disorders, such as schizophrenia (McCarthy et al. 2014; Zhang et al. 2014).

Here, we report on two female patients with non-overlapping exonic deletions in the *AUTS2* gene and describe and compare their neurocognitive, behavioral and clinical profiles. We also perform a systematic review of the main genetic findings and clinical features of previous reports of patients with *AUTS2* variations documented in the literature and compare them with those of our patients.

MATERIALS AND METHODS

DNA samples from both the patients and their parents were obtained from peripheral blood and genotyped with the Affymetrix CytoScan High-Density SNP array (Patients 1 and 2) and the Affymetrix CytoScan 750K SNP array (parents of Patient 1 and mother of Patient 2. The father's DNA was not available for Patient 2). Microarray-based copy number analysis was performed using the Chromosome Analysis Suite software version 1.2.2 (Affymetrix, Santa Clara, CA) and the results were presented on the human genome assembly hg19.

RESULTS

CLINICAL REPORTS

PATIENT 1

Patient 1 is a 12-year-old female of European descent. She is the only child of healthy and non-consanguineous parents, born at full term, after an uncomplicated pregnancy and delivery (birth weight of 2,850 g).

Developmental History. With respect to her early developmental history, she was described as displaying hypersensitivity to certain sounds (noise, loud screams) and some feeding problems. After the age of 3 years, she was referred to the Pediatric Neurology Service because of significant developmental delay, particularly in the perceptual-manipulative and motor domains. Over the time, these difficulties were generalized to language, attention, memory and reasoning abilities. She started to receive educational support and speech therapy as extra-school activities at the age of 6 years. Two years later, she was diagnosed with mild ID and epilepsy of unknown etiology for which she receives chronic medication (Depakine, 200 mg). She also has regular episodes of oppressive biparietal headaches accompanied by photo and sound phobia, receiving medication with good therapeutic response. Magnetic resonance imaging (MRI) examination showed a pineal cyst of doubtful clinical significance.

Neurocognitive and Behavioral Phenotypes. The Wechsler Intelligence Scale for Children - IV (WISC - IV, Wechsler, 2005) was used to assess her general intellectual functioning. We observed that her Full Scale Intelligence Quotient (FSIQ) scored within the mild intellectual impairment interval (FSIQ = 58), displaying a relatively homogeneous performance among the various sub-scales. Nevertheless, an increased better performance in the processing speed index was observed (verbal comprehension index of 70, perceptual reasoning index of 66, working memory index of 64 and processing speed index of 76).

For assessing behavioral and emotional functioning, an extensive psychiatric interview was carried out by a trained child psychiatrist who diagnosed an ADHD-combined type with prominence of impulsivity symptoms. Additionally, the Child Behavior Checklist (CBCL; Achenbach and Rescorla, 2001) showed a predominance of externalizing behaviors, displaying higher scores in Social problems and Aggressive behavior scales. Additionally, scores in the Attention scale were within a borderline interval (T = 65). The Social Communication Questionnaire - B (SCQ - B; Rutter et al. 2003) was applied in order to rule out a possible risk of ASD. Given that the total SCQ - B score was below the cutoff, no additional assessment for ASD was carried out.

Finally, regarding adaptive capacities as communication, daily living skills and socialization, the Vineland Adaptive Behavior Scales - II (VABS - II; Sparrow et al. 2005) showed that the adaptive behavior scores were consistent with those obtained

in the overall cognitive and behavioral assessment (Communication: 61; Socialization: 68; Daily Living Skills: 62)

Physical examination. At the age of 12 years, physical examination shows a height of 123 cm (3rd-10th centile) and a weight of 39.5 kg (40th centile). She presents several mild dysmorphic features that are not shared with her parents, namely an angular craniofacial appearance, prominent nasal tip, anteverted nares and hypertelorism.

Table I completes and summarizes the clinical features exhibited by Patient1.

PATIENT 2

Patient 2 is an 8-year-old female of European descent. She is the only child of healthy and non-consanguineous parents, born at full term, following an uncomplicated pregnancy and delivery (birth weight of 2,770 g).

Developmental History. The first signs of developmental delay were detected when she was 6 months old, especially at the motor and social domains. Motor development was delayed and a late achievement of head control (6 months) and independent walking (18 months) was also described. Socially, the first signs of alarm included lack of crying for demanding attention, no response to her own name, poor eye contact and limited facial expressions. She started to use gestures and pointing when she was 4 years and six months, when she was diagnosed of ASD. Given the extent and severity of autistic symptoms, she received specific early intervention programs when she was 3 years old. Currently, she combines partial attendance to a regular elementary school and an intensive intervention at an ASD special education center.

Neurocognitive and Behavioral Phenotypes. A formal assessment of the general intellectual functioning, receptive and expressive language, and executive functions using standardized instruments was not possible due to lack of expressive language and severity of autistic symptoms. Therefore, we will provide a description of overall development, adaptive skills and receptive vocabulary.

Performance in the Battelle Developmental Inventory (BDI; Newborg et al. 1996), a standardized scale that assesses the level of child development in five areas - Personal-social, Adaptive, Motor, Communication and Cognitive skills - showed a significant developmental delay. Overall, the patient had an equivalent developmental age of 3 years and 7 months (ranging between 43 and 50 months). Lower values were observed in the personal-social scale (41 months) and dissociation within communication domain, whereas receptive language (46 months) contrasted with expressive language skills (were absent and therefore not measurable). Relatively increased receptive skills were consistent with the PPVT-III (Peabody Picture Vocabulary Test - III) receptive vocabulary performance (equivalent age of 5 years and 3 months).

Overall, we observed that autistic symptoms were associated with moderate to severe ID and impairment of expressive language. Our child psychiatric interview included several instruments for assessing behavioral, social-emotional and communication skills. From that interview, we documented severe communications deficits, namely, no expressive oral language, few joint attention behaviors, and the use of rudimentary gestures and vocalizations. In the social area, she exhibited good levels of attachment toward familiar adults, although she had decreased activities, social withdrawal and in the interaction with peers no functional or symbolic play was reported. At a behavioral level, she exhibited stereotypical behaviors, such as flapping, tiptoe or sway. Results in the CBCL revealed a behavioral and social-emotional profile characterized by withdrawal behaviors, social and attention problems. All that scales were above threshold ($T > 70$). This profile was consistent with results obtained in the Autism Diagnostic Observation Schedule - Generic (ADOS - G; Lord et al. 1999) and in the Autism Diagnostic Interview - Revised (ADI - R; Rutter et al. 2003), that scored above the cutoff for ASD. The results of the ADI - R revealed that the social area was the most affected domain (score 25, cutoff 10), evident by the lack of socio-emotional reciprocity and lack of interest in peer relations. In agreement, in the ADOS - G, the social interaction (score of 20, cutoff 12) and the communication (score of 8, cutoff 4) were the most affected domains.

Finally, adaptive skills, as measured by the VABS - II were in agreement with a significant level of disability evaluated by the developmental and behavioral measures. Lower scores on the conceptual and social skills as the communication (standard score of 59) and socialization (standard score of 47) domains were in contrast with moderately lower in daily living skills (standard score of 65) that are more related with practical intelligence.

Physical examination. At the age of 8 years, physical examination shows a height of 125 cm (50th centile) and a weight of 23 kg (25 centile). She shows a slight shortening of the Achilles tendon and several mild dysmorphic features such as front narrowing, bilateral telecanthus and epicanthus with normal interpupillary distance; short philtrum and small mouth with an arched palate. She also has myopia with astigmatism. Neurological assessment shows a pattern of sensory hypersensitivity, particularly to auditory, olfactory and tactile stimuli.

Table I completes and summarizes the clinical features observed in Patient2.

MOLECULAR ANALYSIS

Microarray-based copy number analysis in Patient 1 showed a 305.042 kbp copy number loss at chromosome 7q11.22 (arr 7q11.22(69,206,230-69,511,272)X1 (build 19)) encompassing the second exon of the *AUTS2* gene. A total of 349 markers with a median intermarker distance of 0.879 kbp covered this region. The same finding was also identified in her father (Fig. 1A). Patient 2 showed a non-overlapping 383.118

kbp deletion affecting the last 14 exons of *AUTS2* (arr 7q11.22(69,914,440-70,297,558)X1 (build 19)). In this case, the deleted region was detected with 420 markers with a median intermarker distance of 0.914 kbp. This chromosomal aberration was not present in her mother. The father's sample was not available for genetic analysis (Fig. 1B). No additional rare exonic copy number variant (CNV) was detected in the patients (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we present the phenotypes of two female patients with neurodevelopmental disorders and non-overlapping exonic deletions affecting *AUTS2* (OMIM *607270; autism susceptibility candidate 2). This gene is located upstream from the Williams–Beuren syndrome (OMIM *612547) critical region at chromosome 7q11.22, spans 1.2 Mb and contains 19 exons (Sultana et al. 2002), that encode for a protein of 1,259 amino acids (Beunders et al. 2013). Exons 1-6 represent most of the length of *AUTS2*, since they are separated by relatively long introns; while exons 7-19 are closely packed at the 3' end of the gene (Oksenberg and Ahituv 2013; Oksenberg et al. 2013). Beunders et al. [2013] evaluated the evolutionary conservation of each human *AUTS2* exon and found that conservation was especially high in this 3' region. In human brain, they also identified a shorter 3' mRNA variant starting in the middle of exon 9, predicted to encode a polypeptide of 697 amino acids and with a reading frame identical to that of the full-length *AUTS2* transcript (Beunders et al. 2013).

The first evidence of the involvement of the *AUTS2* gene in neurodevelopmental disorders comes from the identification of a t(7;20) (q11.2;p11.2) translocation, whose breakpoint on chromosome 7 disrupted the gene sequence between exons 2-3, in a pair of monozygotic twins with severe ID, autism and epilepsy (de la Barra et al. 1986; Sultana et al. 2002). Since then, (apparently) balanced rearrangements (including chromosomal translocations and inversions (Kalscheuer et al. 2007; Bakkaloglu et al. 2008; Huang et al. 2010; Beunders et al. 2013; Schneider et al. 2015)) and copy number variants (both deletions and duplications) affecting the *AUTS2* sequence have been described in patients with neurodevelopmental phenotypes. Importantly, most of the *AUTS2* variants identified so far are CNVs, and it has been suggested that this may be due to the susceptibility of this locus to chromosomal breakpoints (Oksenberg and Ahituv 2013). Figure 2 is a schematic overview of the 7q11.22 chromosome band showing the SNP array results in our two patients and previously reported exonic CNVs in the *AUTS2* gene identified in patients with neurodevelopmental disorders, while Table I summarizes the complete genetic findings and clinical features of all these patients. Developmental delay and intellectual disability have been reported in all case descriptions, varying within borderline to severe range. Although less prevalent, sound sensitivity, ASD/autistic features and ADHD/hyperactivity have also been observed as frequent clinical manifestations in these patients. Additionally, the phenotypic spectrum of *AUTS2* disruptions included growth and feeding problems (such as low birth weight, short

stature, microcephaly and feeding difficulties), neurological disorders (namely generalized hypotonia and epilepsy), congenital malformations and dysmorphism (Nagamani et al. 2012; Beunders et al. 2013; Jolley et al. 2013; Amarillo et al. 2014; Beunders et al. 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015) (for more details, see Table I). Importantly, based on their findings on 17 well-characterized patients with *AUTS2* structural variations, Beunders et al. [2013] found that individuals with exonic deletions affecting the 3' part of the gene exhibited a more severe form of syndromic ID and their *AUTS2* syndrome severity scores (expressed as the sum of all clinical features observed more than once in unrelated individuals) were higher than those observed in patients with in-frame exonic deletions in the 5' end of *AUTS2* (with a milder phenotype, mainly restricted to neurocognitive defects with no or mild dysmorphic features or were normal) (Beunders et al. 2013).

Our Patient 1 presents an intragenic deletion affecting the second exon of *AUTS2* and has a neurocognitive profile of mild ID. Compared with patient 1 reported by (Beunders et al. 2013), also with an exon 2 deletion and a diagnosis of mild ID, she also presents a clinical condition of ADHD-combined type, with prominence of impulsivity symptoms and displays several mild dysmorphic features, feeding problems in her first years of life, epilepsy and episodes of photo and sound phobia, apart from recurrent biparietal headaches. Although some of these features have been observed in other patients with deletions in *AUTS2* (see Table I), it seems evident that there are substantial differences between these two patients, despite having deletions affecting the second exon of the gene (Beunders et al. 2013) (see Table I). On the other hand, the CNV was inherited from an unaffected father in both cases (Beunders et al. 2013) (Fig. 1 and 2 and Table I), reinforcing the idea that the same chromosomal aberration may lead to different phenotypes, further complicating genetic counseling and patient management.

Our Patient 2 carries an exonic deletion encompassing the last 14 exons of *AUTS2* and, in agreement with the *AUTS2* syndrome severity score (Beunders et al. 2013), her behavioral and neurocognitive phenotypes and clinical manifestations were more severe than those of our Patient 1 and previous reported patients with in-frame genomic rearrangements in the 5' part of *AUTS2* (Beunders et al. 2013). Indeed, although our two patients exhibit sound sensitivity and behavior problems, Patient 2 presents an early manifestation and a severe form of ASD, with moderate to severe ID and complete absence of expressive language, apart from generalized hypotonia, tight heel cords, myopia and astigmatism, characteristics not observed in Patient 1. As expected, taking into consideration the specific location of the deletion and the severity of the phenotype in Patient 2, her unaffected mother was negative for the genetic test (Fig. 1 and 2 and Table I); however, we could not complete the family genetic analysis since the father sample was unavailable.

In addition to the clinical reports summarized in Table I, other studies with larger cohorts of patients with neurodevelopmental disorders and/or neurological problems

found CNVs in the *AUTS2* gene. Although not detailed clinical information was provided, some of these phenotypes (such as ASD, ADHD or epilepsy) were also present in our patients. Thus, Mefford et al. [2010] identified two unrelated patients exhibiting epilepsy and overlapping intragenic deletions in *AUTS2* (Mefford et al. 2010), while Ben-David et al. [2011] found a male patient with severe ID, autism and epilepsy carrying a rare *AUTS2* duplication, inherited from his affected mother (mild ID) and also present in his sister, with developmental delay but without autism (Ben-David et al. 2011). Once again, these results shown that the same genetic alteration may lead to different phenotypic manifestations. In a cohort of 376 individuals with dyslexia, Girirajan et al. [2011] also identified two patients with *AUTS2* CNVs: a male with an approximately 84 kbp deletion transmitted from the affected paternal grandmother through the unaffected father and a female with a 669 kbp copy number gain (also including the *WBSCR17* gene) inherited from her affected father. Additionally, they detected a 354 kbp *AUTS2* copy number loss in a patient with idiopathic ID, pervasive developmental delay, partial epilepsy, and left hemihypertrophy (Girirajan et al. 2011). Also, Talkowski et al. [2012] identified 30 patients with different phenotypes (including DD, ASD, microcephaly and epilepsy) and CNVs (16 losses and 14 gains) harboring *AUTS2*; among of which 6 encompassed additional genes, while 24 (13 losses and 11 gains) were *AUTS2*-restricted CNVs (Talkowski et al. 2012). Tropeano et al. [2013] found a male patient with DD and microcephaly and a whole-gene deletion. However, this patient carried an additional recurrent 16p13.11 deletion, also linked to neurodevelopmental disorders, making the establishment of genotype-phenotype correlations challenging (Tropeano et al. 2013). Finally, CNVs at the 7q11.22 locus disrupting *AUTS2* were also found in cohorts of patients with ADHD (Elia et al. 2010; Williams et al. 2010), a clinical feature present in our two patients. Although *AUTS2* copy number variants (both exonic and intronic) have also been identified in unaffected parents (as is the case of our Patient 1's parent) and control population (Redon et al. 2006; Bakkaloglu et al. 2008; McCarroll et al. 2008; Kim et al. 2009; Conrad et al. 2010; Ju et al. 2010; Pang et al. 2010; Girirajan et al. 2011; Beunders et al. 2013) and it has been suggested that some structural rearrangements in this gene could be tolerated (Oksenberg and Ahituv 2013), these publications along with the clinical reports summarized in Table I, including our own data, provide strong evidence for the involvement of *AUTS2* in neurodevelopmental disorders.

The *AUTS2* gene is mainly expressed in the brain, although it was also found in the skeletal muscle and kidney, with lower expression in placenta, lung and leukocytes (reviewed by (Oksenberg and Ahituv 2013)). Gene expression analysis of *Auts2* in the mouse brain, from early embryonic stages to postnatal development, shown that this gene was expressed in the cerebral cortex and cerebellum, and was located in the nuclei of neurons and some neuronal progenitors (Bedogni et al. 2010). In zebrafish, *auts2* was found to be highly expressed in the developing brain and its suppression resulted in neuronal reduction and decreased body length and mobility in these

organisms, as well as microcephaly, micrognathia and retrognathia. These craniofacial characteristics are comparable with some dysmorphic features exhibited by patients with *AUTS2* disruptions and were rescued by co-injecting either the full length human *AUTS2* protein and the shorter C-terminal isoform (Beunders et al. 2013; Oksenberg et al. 2013). Thereby, it has been suggested that the last 3' exons of the gene would be crucial, at least for the facial dysmorphism and these findings were concordant with the observation that dysmorphic features were more pronounced in individuals with 3' *AUTS2* deletions (Beunders et al. 2013). In this regard, it is important to note that our two patients present mild dysmorphic features but, importantly and in line with Beunders et al. [2013], the most significant differences in phenotypic severity were found in her neurocognitive profiles (mild ID and absence of ASD in Patient 1 *versus* moderate to severe ID, early onset and severe ASD and severe speech and language disorders in Patient 2) and in the presence of additional abnormalities (only in Patient 2, who was affected with myopia and astigmatism).

The regulation of *AUTS2* was also investigated and potential regulatory elements have been identified in zebrafish and mouse; some of these elements overlapped with a non-coding deletion associated with ASD, while others resided in regions implicated in human evolution. Although the precise function of this gene is largely unknown, it is becoming clear that *AUTS2* is an important and tightly regulated gene implicated in neurodevelopment (Oksenberg et al. 2013). Several studies in different organisms, mainly performed in mice but also in human post-mortem brain, have suggested that *AUTS2* interacts with different genes, including T-box, brain, 1 (*Tbr1* or *TBR1*; OMIM *604616) (a transcription factor that has been linked to ASD), methyl CpG binding protein 2 (*Mecp2* or *MECP2*; OMIM *300005) (a gene implicated in Rett syndrome and autism), SATB homeobox 2 (*Satb2* or *SATB2*; OMIM *608148) (a known regulator of *Tbr1* expression in callosal projection neurons), zinc finger matrin-type 3 (*Zmat3*, also named wildtype p53-induced gene *Wig1*, in human *ZMAT3* or *WIG1*, respectively; OMIM *606452) (a transcription factor regulated by p53, with an important function in RNA protection and stabilization and involved in neurodegenerative diseases) and GTF2I repeat domain-containing 1 (*Gtf2ird1* or *GTF2IRD1*; OMIM *604318) (one of the genes deleted in the Williams–Beuren syndrome). Additionally, *AUTS2* is thought to participate in the notch signaling pathway (that has been implicated in neuronal migration) and in the regulatory pathway of semaphorin 5A (*SEMA5A*; OMIM *609297) (an autism candidate gene) (reviewed by (Oksenberg and Ahituv 2013)). Furthermore, chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq) experiments and RNA sequencing (RNA-seq) analysis performed on mouse embryonic brain shown evidence of association of *Auts2* with promoters and distal enhancers of genes that are active during the development (Oksenberg et al. 2014). Gao et al. [2014] studied the functional implication of the *AUTS2* gene as part of the Polycomb complex (Polycomb group proteins maintain repressive forms of chromatin, favoring adequate patterns of gene repression through epigenetic mechanisms) (PRC1-AUTS2) in the context of neurodevelopment and found that PRC1-AUTS2 exhibited an unexpected

role in transcriptional activation due to the mediation of AUTS2. Moreover, specific deletion of *Auts2* in mouse neuronal progenitor cells resulted in impaired neurodevelopmental phenotypes, in line with the characteristics exhibited by patients with *AUTS2* disruptions (Gao et al. 2014). Although AUTS2 was initially considered as a nuclear protein (Bedogni et al. 2010), immunohistochemical experiments suggested both nuclear and extranuclear localizations for the full-length protein in contrast with the nuclear-specific short isoform. The cytoplasmatic AUTS2 was found to be involved in the regulation of the cytoskeleton and neural development and in cortical neuronal migration and neuritogenesis in the developing brain, through Rac1-signaling pathway (Hori et al. 2014). Finally, behavioral analysis recently performed on *Auts2*-deficient mice shown that heterozygous disruptions of *Auts2* resulted in impaired emotional control and cognitive memory, suggesting that this gene has a critical role for the acquisition of neurocognitive function (Hori et al. 2015).

In conclusion, several lines of evidence have provided support for the importance of *AUTS2* in neurodevelopment. Particularly, we have compared here the neurocognitive and clinical profiles of two female patients with neurodevelopmental disorders and non-overlapping exonic deletions in this gene with patients carrying similar chromosomal aberrations previously documented in the literature. Their core phenotype is mainly characterized by ID/DD, ASD/autistic features, ADHD/hyperactivity and sound sensitivity as well as additional recurrent features, such as microcephaly, early feeding problems and low birth weight, hypotonia and epilepsy. However, and as it is reflected here, the clinical manifestations are extremely variable and dependent on the location of the deletion, with a strong correlation between a higher phenotypic severity and disruptions affecting the 3' end of the gene. Moreover, it has been showed that the same *AUTS2* aberration may result in different phenotypes, as is the case of the exon 2 deletion in our Patient 1, also identified in her unaffected father. These findings illustrate the complexity of interpreting genomic data in the clinical setting and reflect the difficulty of genetic counseling and patient management.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the patients and their families for their cooperation. Genotyping services were provided by the "Centro Nacional de Genotipado - Plataforma de Recursos Biomoleculares y Bioinformáticos - Instituto de Salud Carlos III (CeGen-PRB2-ISCI3)". (Grant PRB2 (IPT13/0001 - ISCIII-SGEFI / FEDER)). The contribution of Fundacion María Jose Jove is also acknowledged with appreciation.



FIGURES AND TABLES

Figure 1: Microarray-based copy number analysis performed with the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2. A) Image of the paternally inherited 305.04 kb deletion at chromosome 7q (arr 7q11.22(69,206,230-69,511,272)X1 (build 19)) in Patient 1. B) Image of the 383.12 kb copy number loss affecting the last 14 exons of *AUTS2* (arr 7q11.22(69,914,440- 70,297,558)X1 (build 19)) in Patient 2, not present in her mother. The father's DNA was not available for genetic analysis. C) The *AUTS2* gene, as plotted in the UCSC Genome Browser (build 19).

Figure 2: Schematic overview of the chromosome band 7q11.22 showing: A) SNP array results in our patients and B) previous reports of patients with detailed phenotypic information in the literature and CNVs affecting at least one exon of *AUTS2* and no more than four additional genes [Nagamani et al., 2012; Beunders et al., 2013; Jolley et al., 2013; Amarillo et al. 2014; Beunders et al., 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015]. Chromosomal translocations [de la Barra et al., 1986; Kalscheuer et al., 2007; Huang et al., 2010; Beunders et al. 2013; Scheneider et al. 2015] and inversions [Bakkaloglu et al., 2008; Beunders et al. 2013] affecting the *AUTS2* gene were not included in this scheme. The UCSC Genome LiftOver Tool was used for converting genome coordinates between hg18 and hg19 assemblies, where necessary. P: Patient; dup: duplication.

Table I: Genotypic and phenotypic features of patients with exonic *AUTS2* copy number variations. Summary of the genetic findings and the most relevant clinical features present in published patients with exonic *AUTS2* copy number variations and in our Patients 1 and 2. Only patients with detailed clinical information were included [Nagamani et al., 2012; Beunders et al., 2013; Jolley et al., 2013; Amarillo et al. 2014; Beunders et al., 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015]. Modified from [Beunders et al., 2013]. (*) A total of 24 individuals were found to have a deletion that affect at least one exon of *AUTS2*. Fifteen out of them (P1-P15) had detailed phenotypic data. A: Genotypic features: P: Patient; del: deletion; dup: duplication; bp: base pairs; E: exons; +: yes; -: no; *dn*: *de novo*; mat: maternal; pat: paternal; ND: not determined; (a) Duplication at 15q11.2 between BP1-BP2. Inherited from the unaffected father; (b) Maternal duplication at chromosome 2 (chr2:38,531,520-38,948,843); (c) Inherited from an affected mother (mild ID, microcephaly); (d) Inherited from an unaffected father; (e) Inherited from an affected mother (borderline to mild ID, dysmorphic features); (f) Inherited from an affected mother (mild to moderate ID, dysmorphic features, skeletal anomalies). B: Phenotypic features: y: years; mo: months; f: female; m: male; +: feature present; -: feature not present; mi: mild, mod: moderate; s: severe; ?: not clear if present; NA: not available; FTT: failure to thrive; (g) Autistic tendencies; (h) Behavioral abnormalities; (i) Severe speech and language disorders; (j) Tonic-clonic seizures/movements; (k) One febrile seizure episode at 2 years of age; EEG normal; (l) Mild tremor; (m) White matter abnormalities; (n) Hyperintense signal periventricular white matter; (o) Ataxic gait; (p) Mild peripheral hypertonia. Stiff movements and poor coordination; (q) Mild scoliosis; (r) Camptodactyly; (s) Radioulnar synostosis; (t) Mild pectus carinatum; (u) Metopic synostosis; (v) Clinodactyly digiti; (w) Pes planus with eversion of the feet; (x) Pes planus. C. Dysmorphic features: P: Patient; NA: not available; +: feature present; -: feature not present; ?: not clear if present; (y) P1, P3 and P4 has dysmorphic features but not detailed information was provided apart from P3

(triangular facies and mid-face hypoplasia); (z) Heart shaped face, high broad forehead with bilateral cowlicks, soft fine hair, bilateral ptosis, large front teeth, extra teeth in the upper jaw, prominent and slightly posteriorly rotated ears, mild micrognathia, arched eyebrows, and a shawl scrotum; (za) P4 (plachiocephaly, brachycephaly, facial asymmetry and prominent forehead), P6 (low columella), P7 (downslant), P8 (large hand and feet), P9 (short forehead), P13 (prominent lips), P14 (large tongue), P15 (prominent cheeks); (zb) Vermilion abnormality.



Figure 1: Microarray-based copy number analysis performed with the Affymetrix Chromosome Analysis Suite version 1.2.2



Figure 2: Schematic overview of the chromosome band 7q11.22

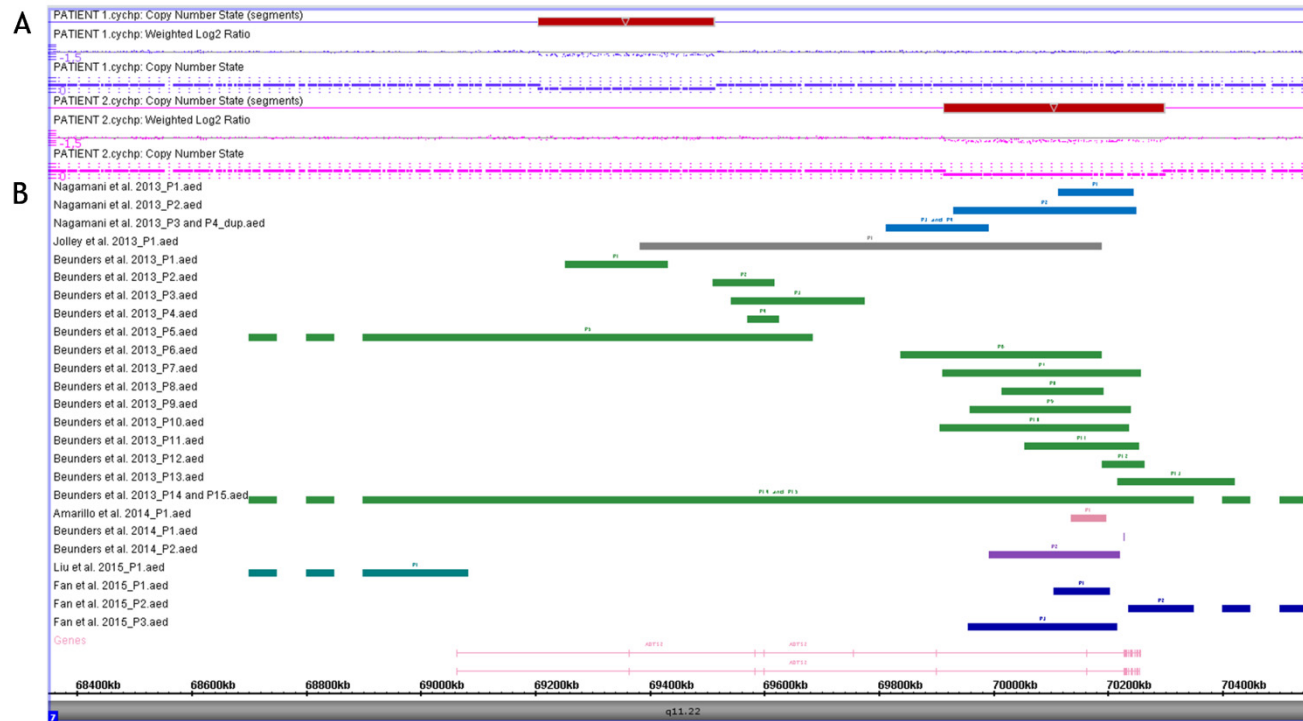


Table I: Genotypic and phenotypic features of patients with exonic *AUTS2* copy number variations

A. Genotypic features	Nagamani et al. (2012)			Jolley et al. (2013)	Beunders et al. (2013) P1-P15 (*)	Amarillo et al. (2014)	Beunders et al. (2014)		Liu et al. (2015)	Fan et al. (2015)			This report		TOTAL
	P1	P2	P3/P4				P1	P2		P1	P2	P3	P1	P2	
Type of <i>AUTS2</i> aberration	del	del	dup	del	del (15/15)	del	del (2 bp)	del	del	del	del	del	del	del	del (27/29)
Exons deleted/duplicated	E6-14	E6-14	E5	E3-6	E2/E3-4/ E1-4/E5-6/E6/E6-9/ E6-11/E6-18/E7-19/ E7-19/E1-19/E1-19	E6	E7	E6	E1	E6	E12-19	E6	E2	E6-19	
Other genes involved	-	-	-	-	P13 (<i>WBSCR17</i> , <i>CALN1</i>), P14 (<i>WBSCR17</i>), P15 (<i>WBSCR17</i> , <i>CALN1</i>)	-	-	-	-	-	<i>WBSCR17</i> , <i>CALN1</i> , <i>TYW1B</i> , <i>POM121</i>	-	-	-	- (25/29) + (4/29)
Other rare exonic CNV	-	-	(a)	-	P13(b)	-	ND	-	ND	-	-	-	-	-	
Inheritance	<i>dn</i>	not mat	mat(c)	<i>dn</i>	pat (d)/ND/ND/mat (e)/ <i>dn</i> /mat (f)/ND/ <i>dn</i> /not pat/ <i>dn</i> /ND/ <i>dn</i> /not mat/ <i>dn</i> / <i>dn</i> (<i>dn</i> : 6/9)	<i>dn</i>	<i>dn</i>	<i>dn</i>	<i>dn</i>	<i>dn</i>	<i>dn</i>	<i>dn</i>	pat	not mat	<i>dn</i> (12/17) mat (3/17) pat (2/17)

B. Phenotypic features	Nagamani et al. (2012)			Jolley et al. (2013)	Beunders et al. (2013) P1-P15 (*)	Amarillo et al. (2014)	Beunders et al. (2014)		Liu et al. (2015)	Fan et al. (2015)			This report		TOTAL	
	P1	P2	P3/P4	(2013)			P1	P2	(2015)	P1	P2	P3	P1	P2		
General																
Sex	f	f	f/m	m	m/f/m/f/f/f/m/m/ f/f/f/f/m/f/m (9f/6m)	f	m	m	m	m	f	f	f	f	f (17/29) m (12/29)	
Growth and feeding																
Low birth weight <p3	NA	NA	NA	-	P3, P6, P10, P12, P14 (5/13; P2, P7: NA)	NA	+	-	-	-	-	-	-	+	7/22	
Short stature <p10	-	-	-/NA	+	P3, P6-P11, P13, P15 (9/14; P2: NA)	-	-	+	-	+	+	-	+	-	14/27	
Microcephaly <p2	-	-	+/-	NA	P3-P11, P13, P15 (11/15)	-	+	+	-	+	-	-	-	-	15/28	
Feeding difficulties	NA	NA	NA	+	P5, P6, P9, P12, P13, P15 (6/15)	-	+	+	-	+	+	-	+	-	12/25	
Neurodevelopmental disorders																
ID/DD	+	mod-s	mi-mod /+	+	mi/+/+/+/+mi/+/+mod/ mi-mod/mi+/s+/mi (15/15)	mod	+	+	+	+	+	+	mi	mod-s	29/29	
A/autistic behavior/ASD	-	-	+/+	-(g)	P3, P5, P9, P12, P13 (5/15); P8: -?	?	+	+	+	+	+	-	-	+	13/29	
Sound sensitivity	NA	NA	NA	+	P14, P15 (2/5; P2-P7, P10-P13: NA)	NA	+	-	-	-	-	+	+	+	7/14	
Hyperactivity/ADHD	NA	NA	NA	NA	P7, P14 (2/15)	NA	+	-	+	+	+	+	+	+	9/23	
Other			/(h)		P13 (almost no speech)	(i)	(i)							(i)		

B. Phenotypic features	Nagamani et al. (2012)			Jolley et al. (2013)	Beunders et al. (2013) P1-P15 (*)	Amarillo et al. (2014)	Beunders et al. (2014)		Liu et al. (2015)	Fan et al. (2015)			This report		TOTAL	
	P1	P2	P3/P4				P1	P2		P1	P2	P3	P1	P2		
Neurological disorders																
Generalized hypotonia	NA	NA	NA	+	P5, P9, P11-13, P15 (6/15)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	9/25	
Structural brain anomaly	-	-	NA	NA	P2, P10, P12 (3/10; P1, P4, P6, P7, P9: NA)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	5/21	
Cerebral palsy/spasticity	-	-	-(j)	NA	P2, P7, P8, P10-P15 (9/15)	(j)	-	-	-	-	-	-	-	-	11/28	
Epilepsy /seizures	-	-	-(j)	-(k)	P1-P15: NA	(j)	-	NA	-	+	+	-	+	-	4/13	
Other				(l)	P2: (m), P10: (n), P13: (o)			(p)								
Skeletal disorders																
Kyphosis/scoliosis	(q)	NA	NA	NA	P9, P10 (mild) (2/13; P2, P15: NA)	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	4/22	
Arthrogryposis/ shallow palmar creases	NA	NA	NA	NA	P9 (1/14; P2: NA)	NA	+	+	-	-	-	-	-	-	3/22	
Tight heel cords	NA	NA	NA	NA	P7, P10, P12, P14, P15 (5/7; P2, P4-P6, P8, P9, P11, P13: NA)	NA	-	-	-	-	-	-	-	+	6/15	
Other	(r)		(s)/-		P5: (t), P11: (u), P14 (v)	(w)							(x)			
Congenital malformations																
Hernia umbilicalis/ inguinalis	NA	NA	NA	NA	P10, P13 (2/15)	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	2/23	
Patent foramen ovale/ atrial septum defect	+	NA	NA	NA	P4, P13, P15 (3/15)	NA	-	-	-	-	-	-	-	-	3/23	
Other	FTT			Dental anomalies					Slight hearing loss			Myopia, astigmatism				

C. Dysmorphic features	Nagamani et al. (2012)			Jolley et al. (2013)	Beunders et al. (2013)	Amarillo et al. (2014)	Beunders et al. (2014)		Liu et al. (2015)	Fan et al. (2015)			This report		TOTAL
	P1	P2	P3/P4		P1-P15 (*)		P1	P2		P1	P2	P3	P1	P2	
Highly arched eyebrows	NA	-	NA	+	P5, P6, P9, P11, P13 (5/15)	-	-	+	-	+	+	+	-	-	10/26
Hypertelorism	NA	-	NA	-	P6, P8, P9, P12, P13, P15 (6/15)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	10/26
Proptosis	NA	-	NA	-	P4, P6, P9, P11, P13 (5/15)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	7/26
Short palpebral fissures	NA	-	NA	-	P4-P6, P9, P15 (5/15)	-	-	+	-	-	+	-	-	-	7/26
Up slanting palpebral fissures	NA	-	NA	+	P9, P15 (2/15)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	4/26
Ptosis	NA	-	NA	+	P2, P6, P9, P13 (4/15)	-	+	+	-	-	-	-	-	-	7/26
Epicanthal fold	NA	-	NA	-	P5, P7, P8, P10, P11, P13 (5/15)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	7/26
Strabismus	NA	-	NA	-	P2, P3, P6, P9, P10 (5/15)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	7/26
Prominent nasal tip	NA	-	NA	+	P6, P9, P10 (3/15)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	7/26
Anteverted nares	NA	-	NA	-	P9, P10 (2/15)	-	-	-	-	+	+	+	+	-	6/26
Deep/broad nasal bridge	NA	-	NA	-	P5, P7, P9, P13-15 (6/15)	-	+	+	-	+	+	+	-	-	11/26
Short/upturned philtrum	NA	-	NA	+	P5, P6, P9, P13, P15 (5/14; P7: NA)	-	+	+	-	-	+	+	-	+	11/25
Micro/retrognathia	NA	-	NA	mild	P6, P8, P9, P13, P15 (5/14; P5: NA)	-	-	+	-	+	-	-	-	-	8/25
Low set ears	NA	-	NA	?	P6, P8, P9 (3/15)	-	-	+	-	-	-	+	-	-	5/25
Ear pit/other malformation	NA	-	NA	?	P10 (1/15)	-	-	-	-	+	+	+	-	-	4/25
Narrow mouth	NA	-	NA	?	P4-P7, P9, P10, P13, P15 (8/15)	-	-	-	-	+	-	+	-	+	11/25
Other	(y)		(y)/(y)	(z)	P4, P6-P9, P13-P15 (za)					(zb)	(zb)	(zb)		Telecanthus	

REFERENCES

- Amarillo IE, Li WL, Li X, Vilain E, Kantarci S. 2014. De novo single exon deletion of AUTS2 in a patient with speech and language disorder: a review of disrupted AUTS2 and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet A* **164A**(4): 958-965.
- Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA et al. 2008. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **82**(1): 165-173.
- Bedogni F, Hodge RD, Nelson BR, Frederick EA, Shiba N, Daza RA, Hevner RF. 2010. Autism susceptibility candidate 2 (Auts2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene expression patterns : GEP* **10**(1): 9-15.
- Ben-David E, Granot-HersHKovitz E, Monderer-Rothkoff G, Lerer E, Levi S, Yaari M, Ebstein RP, Yirmiya N, Shifman S. 2011. Identification of a functional rare variant in autism using genome-wide screen for monoallelic expression. *Hum Mol Genet* **20**(18): 3632-3641.
- Beunders G, de Munnik SA, Van der Aa N, Ceulemans B, Voorhoeve E, Groffen AJ, Nillesen WM, Meijers-Heijboer EJ, Kooy RF, Yntema HG et al. 2014. Two male adults with pathogenic AUTS2 variants, including a two-base pair deletion, further delineate the AUTS2 syndrome. *Eur J Hum Genet*.
- Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, Simonic I, Lionel AC, Vergult S, Pyatt RE et al. 2013. Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet* **92**(2): 210-220.
- Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P et al. 2010. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature* **464**(7289): 704-712.
- de la Barra F, Skoknic V, Allende A, Raimann E, Cortes F, Lacassie Y. 1986. [Twins with autism and mental retardation associated with balanced (7;20) chromosomal translocation]. *Revista chilena de pediatria* **57**(6): 549-554.
- Elia J, Gai X, Xie HM, Perin JC, Geiger E, Glessner JT, D'Arcy M, deBerardinis R, Frackelton E, Kim C et al. 2010. Rare structural variants found in attention-deficit hyperactivity disorder are preferentially associated with neurodevelopmental genes. *Mol Psychiatry* **15**(6): 637-646.
- Fan Y, Qiu W, Wang L, Gu X, Yu Y. 2015. Exonic deletions of AUTS2 in Chinese patients with developmental delay and intellectual disability. *Am J Med Genet A*.
- Gao Z, Lee P, Stafford JM, von Schimmelmann M, Schaefer A, Reinberg D. 2014. An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* **516**(7531): 349-354.
- Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, Shafer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M et al. 2011. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet* **7**(11): e1002334.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP et al. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**(7246): 569-573.
- Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yamada K, Hoshino M. 2015. Heterozygous Disruption of Autism susceptibility candidate 2 Causes Impaired Emotional Control and Cognitive Memory. *PLoS One* **10**(12): e0145979.

- Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K et al. 2014. Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neuritogenesis. *Cell reports* **9**(6): 2166-2179.
- Huang XL, Zou YS, Maher TA, Newton S, Milunsky JM. 2010. A de novo balanced translocation breakpoint truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. *Am J Med Genet A* **152A**(8): 2112-2114.
- Jolley A, Corbett M, McGregor L, Waters W, Brown S, Nicholl J, Yu S. 2013. De novo intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with developmental delay: a case report and literature review. *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1508-1512.
- Ju YS, Hong D, Kim S, Park SS, Kim S, Lee S, Park H, Kim JI, Seo JS. 2010. Reference-unbiased copy number variant analysis using CGH microarrays. *Nucleic Acids Res* **38**(20): e190.
- Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F et al. 2007. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet* **121**(3-4): 501-509.
- Kim JI, Ju YS, Park H, Kim S, Lee S, Yi JH, Mudge J, Miller NA, Hong D, Bell CJ et al. 2009. A highly annotated whole-genome sequence of a Korean individual. *Nature* **460**(7258): 1011-1015.
- Liu Y, Zhao D, Dong R, Yang X, Zhang Y, Tammimies K, Uddin M, Scherer SW, Gai Z. 2015. De novo exon 1 deletion of AUTS2 gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: A case report and a brief literature review. *Am J Med Genet A*.
- McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, Shapero MH, de Bakker PI, Maller JB, Kirby A et al. 2008. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet* **40**(10): 1166-1174.
- McCarthy SE, Gillis J, Kramer M, Lihm J, Yoon S, Berstein Y, Mistry M, Pavlidis P, Solomon R, Ghiban E et al. 2014. De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability. *Mol Psychiatry* **19**(6): 652-658.
- Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, Franke A, Malafosse A, Genton P, Thomas P et al. 2010. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet* **6**(5): e1000962.
- Nagamani SC, Erez A, Ben-Zeev B, Frydman M, Winter S, Zeller R, El-Khechen D, Escobar L, Stankiewicz P, Patel A et al. 2012. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*.
- Oksenberg N, Ahituv N. 2013. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet* **29**(10): 600-608.
- Oksenberg N, Haliburton GD, Eckalbar WL, Oren I, Nishizaki S, Murphy K, Pollard KS, Birnbaum RY, Ahituv N. 2014. Genome-wide distribution of Auts2 binding localizes with active neurodevelopmental genes. *Translational psychiatry* **4**: e431.
- Oksenberg N, Stevison L, Wall JD, Ahituv N. 2013. Function and Regulation of AUTS2, a Gene Implicated in Autism and Human Evolution. *PLoS Genet* **9**(1): e1003221.
- Pang AW, MacDonald JR, Pinto D, Wei J, Rafiq MA, Conrad DF, Park H, Hurler ME, Lee C, Venter JC et al. 2010. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol* **11**(5): R52.

- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W et al. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**(7118): 444-454.
- Schneider A, Puechberty J, Ng BL, Coubes C, Gatinois V, Tournaire M, Girard M, Dumont B, Bouret P, Magnetto J et al. 2015. Identification of disrupted *AUTS2* and *EPHA6* genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation t(3;7) with intellectual disability and neurodevelopment disorder. *Am J Med Genet A*.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D et al. 2002. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* **80**(2): 129-134.
- Talkowski ME, Rosenfeld JA, Blumenthal I, Pillalamarri V, Chiang C, Heilbut A, Ernst C, Hanscom C, Rossin E, Lindgren AM et al. 2012. Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell* **149**(3): 525-537.
- Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, Pal DK, McGuffin P, Farmer A, White PS et al. 2013. Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* **8**(4): e61365.
- Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K, Fossdal R, Stefansson H, Stefansson K, Magnusson P, Gudmundsson OO et al. 2010. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* **376**(9750): 1401-1408.
- Zhang B, Xu YH, Wei SG, Zhang HB, Fu DK, Feng ZF, Guan FL, Zhu YS, Li SB. 2014. Association study identifying a new susceptibility gene (*AUTS2*) for schizophrenia. *International journal of molecular sciences* **15**(11): 19406-19416.







DISCUSIÓN



4 DISCUSIÓN

Los avances tecnológicos de los últimos años han permitido incrementar sustancialmente los conocimientos de la variación genética humana provocando la necesidad de avances paralelos en la interpretación y el análisis del impacto funcional y clínico de dicha variación. En el año 2010, el consorcio ISCA recomendó la utilización de los paneles de CGH y de SNPs como la primera prueba genética en pacientes con fenotipos como DI, retraso del desarrollo, TEA y anomalías congénitas y estableció las recomendaciones para el análisis y la clasificación de las CNVs detectadas mediante estas técnicas moleculares (Miller et al. 2010). También el *American College of Medical Genetics* y diversos grupos de investigación han publicado sus guías, recomendaciones y consideraciones para la estandarización de la interpretación diagnóstica de estas variantes (Buysse et al. 2009; Koolen et al. 2009; Stankiewicz y Lupski 2010; Vissers et al. 2010b; Kearney et al. 2011; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013; Schaefer et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013).

En este trabajo, hemos evaluado la utilidad de dos paneles de SNPs de alta densidad del genoma completo en la detección de CNVs clínicamente relevantes en un total de 959 pacientes con trastornos del neurodesarrollo pertenecientes a dos cohortes. La primera cohorte está constituida por un total de 625 pacientes con RGD/DI, con/sin otras condiciones médicas, evaluados clínicamente en el Servicio de Neurología Pediátrica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y enviados a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) para su estudio genético mediante paneles de SNPs del genoma completo (Affymetrix Cytogenetics Whole-Genome 2.7M SNP *array* y Affymetrix CytoScan High-Density SNP *array*) (**ARTÍCULO I**). La segunda cohorte la conforman 334 muestras de ADN de individuos con TEA, presenten o no condiciones médicas adicionales, incluidos en el proyecto de investigación colaborativo entre la Fundación María José Jove y la FPGMX: "Diagnóstico genético en niños y adolescentes con autismo, déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y trastorno obsesivo compulsivo (TOC)" (Affymetrix CytoScan High-Density SNP *array*) (**ARTÍCULO VII**).

Un criterio principal para evaluar el impacto clínico de las CNVs consiste en distinguir aquellas que están catalogadas como polimorfismos en las bases de datos -públicas o internas del propio laboratorio- y/o en la literatura científica (en cuyo caso se considerarían potencialmente benignas) de aquellas variantes que son raras (con mayor probabilidad de ser patogénicas) (Buysse et al. 2009; Koolen et al. 2009; Miller et al. 2010; Vissers et al. 2010b; Kearney et al. 2011; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013).

Otro de los puntos empleados para evaluar la patogenicidad de una CNV consiste en determinar si se trata de un evento heredado o *de novo*, especialmente si la región genómica implicada no ha sido previamente asociada con el fenotipo en estudio. Las CNVs heredadas de padres fenotípicamente normales se consideran, habitualmente, menos patogénicas que

aquellas que se presentan *de novo* en el individuo afecto (Buysse et al. 2009; Koolen et al. 2009; Miller et al. 2010), especialmente en fenotipos graves con fertilidad reducida, como la DI y algunas anomalías congénitas (Vulto-van Silfhout et al. 2013). Sin embargo, es necesario atender a esta cuestión con precaución y tener en cuenta las siguientes consideraciones:

(1) Las CNVs afectan frecuentemente a genes recesivos (Boone et al. 2013) por lo que la medida de su patogenicidad debe contemplar no sólo efectos dominantes, sino también modelos de enfermedad de herencia recesiva (Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011; Almal y Padh 2012; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013). Así, una pérdida heterocigota en ambos progenitores puede resultar en una pérdida homocigota clínicamente relevante en la descendencia (Knijnenburg et al. 2009; Lepichon et al. 2010; Loddo et al. 2013). También, una deleción heredada de un progenitor no afecto puede albergar un gen de morbilidad con herencia recesiva y que podría ser patogénica en combinación con una SNV en el alelo no delecionado -bien heredada del otro progenitor o *de novo*- (Miller et al. 2010; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013), con múltiples ejemplos de esta heterocigosidad compuesta en la literatura científica (Vorstman et al. 2011; Paciorkowski et al. 2013; McInerney-Leo et al. 2014).

(2) Las CNVs del cromosoma X son, con frecuencia, difíciles de interpretar debido a que el efecto de dosis difiere entre hombres y mujeres, requiriendo criterios de evaluación diferentes a los de las CNVs autosómicas (Isrie et al. 2012; Willemsen et al. 2012a). Así, una variante causal en un paciente varón puede haber sido heredada de una madre portadora no afecta (Koolen et al. 2009; Kearney et al. 2011; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013). En mujeres, el impacto fenotípico de una CNV ligada al X puede variar ampliamente debido a la inactivación desviada de este cromosoma y, además, porque el patrón de inactivación puede diferir entre tipos celulares (Lee y Bartolomei 2013). No obstante, aunque los estudios de inactivación del X pueden resultar informativos, no todos los trastornos ligados a este cromosoma se explican por este mecanismo en mujeres portadoras y, además, no siempre es posible estudiar todos los tejidos potencialmente implicados en el fenotipo. Por ello, una alternativa (o estudio complementario) consistiría en buscar otros familiares varones por línea materna a los que hacer la prueba de portadores (de forma que, cuando no se encuentra/n portador/es varón/es de la misma CNV, su patogenicidad permanecería sin explicar) (Kearney et al. 2011; Hehir-Kwa et al. 2013).

(3) La existencia de mosaicismo parental y/o de *imprinting* genómico podrían condicionar la patogenicidad de las CNVs (Koolen et al. 2009; Miller et al. 2010; Vissers et al. 2010b; Kearney et al. 2011; de Leeuw et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013). Por un lado, el mosaicismo, definido como la presencia de células con diferente composición genética dentro de un mismo individuo, resultado de un evento post-zigótico que puede afectar tanto a células somáticas como germinales (Youssoufian y Pyeritz 2002; Conlin et al. 2010), es también una evidencia en las CNVs, con múltiples ejemplos en la literatura científica (Lu et al. 2008; Notini et al. 2008; Pham et al. 2014). Por otro lado, la región de la CNV puede contener genes *improntados*, de forma tal que la manifestación del fenotipo depende de si dicha variante es de origen materno o paterno (Lee y Bartolomei 2013), también con ejemplos que evidencian la existencia de estos mecanismos en algunos trastornos del neurodesarrollo asociados a CNVs recurrentes (Buiting 2010; Piard et al. 2010; Demars y Gicquel 2012).

(4) Aquellas CNVs que solapan con regiones clínicamente relevantes (como las asociadas a síndromes de microduplicaciones y microdeleciones recurrentes conocidos) se consideran también (potencialmente) patogénicas independientemente del patrón de herencia (Koolen et

al. 2009; Lee y Scherer 2010; Miller et al. 2010; Vissers et al. 2010b; Kearney et al. 2011) debido a que, frecuentemente, alteraciones en esas regiones se asocian con expresividad variable y penetrancia incompleta (Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013) (ver apartado "1.2.3.3.2 *Causas de la expresividad variable y la penetrancia incompleta*" de la Introducción).

Además de la frecuencia poblacional y el patrón de herencia de las CNVs, el estudio del efecto de estas variantes sobre un fenotipo clínico implica definir correctamente su tipo (ganancia o pérdida), tamaño, localización (intersticial, centromérica, (sub)telomérica) y puntos de rotura, así como caracterizar correctamente el número y el contenido de genes afectados (especialmente en relación a la sensibilidad de dosis, función, patrón de expresión y asociación conocida con enfermedad) (Buysse et al. 2009; Kearney et al. 2011; Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013):

(1) Tipo (pérdida o ganancia): Aunque es más probable que una pérdida de copia de uno o más genes tenga un efecto patogénico que la ganancia de copia del/de los mismo/s gen/es (Hehir-Kwa et al. 2013), la función de un gen puede verse alterada tanto por la pérdida como por la ganancia - total o parcial- del mismo. El mecanismo principal por el que una delección puede afectar al fenotipo de las enfermedades dominantes se conoce con el nombre de haploinsuficiencia; es decir, la pérdida de una copia del gen provoca que la copia no delecionada sea insuficiente para mantener su funcionalidad normal (Seidman y Seidman 2002; Dang et al. 2008). Una ganancia, por su parte, será considerada patogénica si afecta a una región de un síndrome de microduplicación conocido, si existen en la literatura pacientes con ganancias solapantes y fenotipos comparables, si la función y/o el patrón de expresión de los genes contenidos en dicha CNV puede relacionarse con el fenotipo (Hanemaaijer et al. 2012) y/o si contiene genes sensibles al incremento de dosis (Miller et al. 2010). La identificación tanto de los genes haploinsuficientes como triplosensibles es, por tanto, necesaria para discernir las delecciones y duplicaciones benignas de las patogénicas; para ello, contamos con bases de datos como el *ClinGen Dosage Sensitivity Map* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>), donde se catalogan a los genes en función de su sensibilidad de dosis. En cuanto al mecanismo de patogenicidad, una ganancia puede tener consecuencias clínicas debido al número incrementado de copias del gen o por alterar a los genes cercanos a los puntos de rotura; por ello, es importante saber, además, si se trata de una duplicación en tándem, una inversión, una inserción en otra localización del genoma o un cromosoma marcador supernumerario (Hanemaaijer et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013). Como consecuencia, resulta importante realizar técnicas complementarias, como la FISH, que ayuden a localizar las ganancias y determinar si, por su ubicación y puntos de rotura, podrían tener relevancia clínica (Neill et al. 2011; Nowakowska et al. 2012)

(2) Tamaño: En relación al tamaño, es más probable que las alteraciones más largas sean patogénicas ya que el número de genes sensibles a dosis incrementará, potencialmente, con el aumento del tamaño del intervalo afectado (Buysse et al. 2009; Hehir-Kwa et al. 2013); aunque también hay excepciones y la afectación de un único gen puede causar un fenotipo clínico (Mikhail et al. 2011), tal y como ocurre con algunos de nuestros pacientes (ver más adelante en esta Discusión).

(3) La localización y el número y contenido génico de las CNVs son puntos relacionados y de los más relevantes para la interpretación clínica de estas variantes (Kearney et al. 2011). Por un lado, conocer la localización -intersticial, centromérica o (sub)telomérica) y los puntos

de rotura exactos de una CNV nos permite saber si ésta alberga, está contenida o solapa con regiones definidas para desequilibrios genómicos recurrentes (como síndromes de microduplicaciones/microdeleciones recíprocas conocidos) o no recurrentes pero previamente identificados en pacientes con fenotipos comparables (Miller et al. 2010; Kearney et al. 2011). Por otro lado, una vez identificado/s el gen/es alterado/s, debemos estudiar la función y el perfil de expresión (Hehir-Kwa et al. 2013) del/de los mismo/s y averiguar si está/n catalogado/s como sensible/s a dosis y/o asociado/s con trastornos clínicos relacionados con el fenotipo en estudio. Para evaluar el impacto clínico de una CNV que afecta a genes con mutaciones publicadas en la literatura médica es importante tener en cuenta el mecanismo genético subyacente; así, por ejemplo: (a) un gen asociado a un fenotipo clínico debido a haploinsuficiencia puede no tener consecuencias (o asociarse a un fenotipo diferente) si se incrementa su número de copias; (b) una SNV y una CNV pueden diferir en su patogenicidad; (c) ganancias en el número de copias que implican sólo parte del gen pueden resultar en la no funcionalidad del mismo y/o en una secuencia codificante alterada y no deberían desconsiderarse sin investigar más en profundidad, sobre todo si implica genes sensibles a dosis; (d) las deleciones de una única copia en genes asociados a enfermedad recesiva podrían sólo sugerir el estado de portador para esa condición y (e) nuestro conocimiento actual de los posibles efectos de una CNV en regiones no codificantes es más limitado y, en consecuencia, las CNVs intrónicas o intergénicas son, frecuentemente, descartadas durante la interpretación clínica y no se incluyen en los informes médicos (Kearney et al. 2011; Hehir-Kwa et al. 2013). Una excepción a esto último podría ser si la CNV excede un tamaño establecido por el laboratorio o si se localiza próxima a una región bien caracterizada con clara relevancia en el fenotipo del individuo en estudio (Kearney et al. 2011). Por ello, algunos autores recomiendan evaluar las regiones flanqueantes (+/- 1 Mb) de una CNV en búsqueda de genes (de enfermedad) relevantes que podrían ser diana de efectos posicionales (Hehir-Kwa et al. 2013) y se ha sugerido que CNVs en regiones desiertas de genes o intrónicas podrían tener también relevancia clínica (Vetro et al. 2012; Hehir-Kwa et al. 2013; Spielmann y Klopocki 2013), dependiendo de si son heredadas o *de novo* y/o del contexto genómico (por ejemplo, si afectan a elementos reguladores), con algunos ejemplos en la literatura del papel de CNVs en estas regiones en trastornos del neurodesarrollo (Bonnet et al. 2012; Spielmann y Klopocki 2013; Walker y Scherer 2013; Turner et al. 2016).

Además de la importancia de los avances tecnológicos, es necesario disponer de herramientas de trabajo fiables, útiles y actualizadas para favorecer tanto la investigación de las CNVs como su aplicación al diagnóstico clínico. En este sentido, disponemos de bases de datos de catalogación de CNVs identificadas tanto en la población general - la *Database of Genomic Variants* o DGV (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) - como en individuos afectados - la *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* o DECIPHER (<http://decipher.sanger.ac.uk/>) y el *European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations* o ECARUCA (<http://www.ecaruca.net>) (Feenstra et al. 2006; Zhang et al. 2006; Firth et al. 2009; Corpas et al. 2012). Además, contamos con la base de datos de genes y fenotipos genéticos humanos OMIM (*Online Mendelian Inheritance In Man*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>) y de variación genómica ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) para el análisis de CNVs detectadas mediante técnicas de *arrays* de CGH y de SNPs en relación con fenotipos como DI, retraso del desarrollo o TEA. Otras bases de datos de utilidad para la clasificación e interpretación clínica de las CNVs incluyen: ClinGen Dosage Sensitivity Map (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbvar/clingen/>), donde se recopilan las evidencias que

apoyan la sensibilidad a dosis de genes o regiones genómicas y PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), donde se compila la literatura científica publicada. Otra herramienta de gran utilidad en los laboratorios clínicos consiste en el desarrollo de bases de datos internas de CNVs (pacientes y controles) para ayudar a discriminar las variantes polimórficas (potencialmente benignas) de las raras (con mayor probabilidad de ser patogénicas) en la población en estudio.

Teniendo en cuenta todos los aspectos para la interpretación clínica de las CNVs anteriormente comentados, las variantes detectadas en los pacientes de nuestras cohortes de DI y TEA se clasificaron en las siguientes categorías diagnósticas:

CNVs clínicamente relevantes. En este primer grupo se incluyeron aquellas CNVs consideradas definitivamente patogénicas; es decir, variantes que han sido previamente asociadas con trastornos del neurodesarrollo (y/o psiquiátricos) o relacionadas causalmente con el fenotipo, en base a su tipo, patrón de herencia, tamaño, localización y/o contenido génico (Kearney et al. 2011). Estas variantes clínicamente relevantes representaron un 36,0% y un 23,5% del total de las CNVs exónicas raras detectadas en nuestras cohortes de DI y de TEA, respectivamente y se subclasificaron en las siguientes categorías:

(a) *Trastornos genómicos conocidos* (23,7% y 14,1% de las CNVs exónicas raras detectadas en los pacientes de las cohortes de DI y TEA, respectivamente): Dentro de esta categoría se incluyeron síndromes de microdelección/microduplicación, típicamente recurrentes, implicados en diversos trastornos del neurodesarrollo y del comportamiento (como RGD/DI, TEA, TDAH y ACM), epilepsia y/o trastornos psiquiátricos (como esquizofrenia, depresión mayor y trastorno bipolar) (Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013).

Predominantemente, los reordenamientos cromosómicos recurrentes tienen lugar por NAHR entre repeticiones genómicas de bajo número de copias (LCRs/SDs) o entre secuencias altamente repetitivas (*high-copy repeats* en inglés) que generan inestabilidad genómica local (Stankiewicz y Lupski 2002):

Los desequilibrios cromosómicos en los loci 16p11.2 y 22q11.2 fueron los hallazgos más frecuentes, con 10 y 6 CNVs respectivamente, en nuestra cohorte de DI (**ARTÍCULO I**); mientras que las microdelecciones y microduplicaciones 15q11.2 (n=4) predominaron en la cohorte de TEA (**ARTÍCULO VII**). La compleja arquitectura genómica del brazo p del cromosoma 16, donde más del 10% de la región eucromática está compuesta por LCRs (con tamaños comprendidos entre 20-600 kb y compartiendo más del 97% de sus secuencias) (Loftus et al. 1999; Martin et al. 2004), hace que sea susceptible de reordenamientos genómicos recurrentes, mediados principalmente por NAHR (Stankiewicz y Lupski 2002) y asociados con diversos síndromes de microdelección/microduplicación. Desde el centrómero al telómero, algunas de estas alteraciones incluyen la delección 16p11.2 de ~600 kb (caracterizada, principalmente, por DI, TEA, epilepsia, obesidad y/o macrocefalia; OMIM 601913) y su duplicación recíproca (asociada a DI, TEA, esquizofrenia, bajo peso y/o microcefalia; OMIM 614671) (Hernando et al. 2002; Kumar et al. 2008; Weiss et al. 2008; Bijlsma et al. 2009; McCarthy et al. 2009; Fernandez et al. 2010; Rosenfeld et al. 2010; Shinawi et al. 2010; Walters et al. 2010; Blaker-Lee et al. 2012; Golzio et al. 2012; Zufferey et al. 2012), la microdelección 16p11.2 distal de ~200 kb y que incluye al gen *SH2B1* (ligada a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo retraso del desarrollo y obesidad, pero que se extiende hasta fenotipos normales; OMIM 613444) (Bachmann-Gagescu et al. 2010), la delección 16p11.2-16p12.2 de ~8-9 Mb (asociada con retraso del desarrollo, DI y rasgos

dismórficos leves, entre otros fenotipos como defectos cardíacos y baja estatura; OMIM 613604) y su duplicación recíproca (asociada a DI, TEA y rasgos dismórficos) (Finelli et al. 2004; Ballif et al. 2007; Battaglia et al. 2009; Hempel et al. 2009; Barber et al. 2012), la microdelección 16p12.2 de ~520 kb (encontrada en pacientes con retraso del desarrollo, DI desde leve a profunda, problemas en el crecimiento, malformaciones cardíacas, epilepsia y problemas psiquiátricos y/o del comportamiento; OMIM 136570) (Girirajan et al. 2010; Girirajan et al. 2012) y la microdelección 16p13.11 (descrita en pacientes con fenotipos del neurodesarrollo y del comportamiento (como DI, RGD, ACM y autismo) (Ullmann et al. 2007; Hannes et al. 2009; Nagamani et al. 2010; Balasubramanian et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Ramalingam et al. 2011; Sanders et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Rosenfeld et al. 2012; Tropeano et al. 2013), neurológicos (diferentes tipos de epilepsia, convulsiones) (de Kovel et al. 2010; Heinzen et al. 2010; Mefford et al. 2010; Balasubramanian et al. 2011; Ramalingam et al. 2011; Liu et al. 2012; Helbig et al. 2013) y psiquiátricos (como esquizofrenia) (Ingason et al. 2011; Kirov et al. 2013) y la microduplicación 16p13.11 recíproca (encontrada en DI, RGD, ACM, autismo) (Ullmann et al. 2007; Hannes et al. 2009; Mefford et al. 2009; Nagamani et al. 2010; Girirajan et al. 2011; Ramalingam et al. 2011; Sanders et al. 2011; Girirajan et al. 2012; Tropeano et al. 2013), TDAH (Williams et al. 2010a) y esquizofrenia (Ingason et al. 2011; Kirov et al. 2013). La región 22q proximal alberga 8 LCRs, denominadas LCR22 A-H (desde el extremo proximal al distal) (Edelmann et al. 1999; Portnoi et al. 2005; Portnoi 2009), siendo también susceptible de reordenamientos asociados con diversos trastornos genómicos, como el síndrome de DiGeorge (DGS; OMIM 188400) y el síndrome velocardiofacial (VCFS; OMIM 192430), causados por deleciones hemicigotas 22q11.2 de 1,5 a 3,0 Mb; el síndrome de la duplicación 22q11.2 (OMIM 608363), causado por duplicaciones recíprocas de la región del DGS/VCFS; el síndrome del ojo de gato (CES; OMIM 115470), debido a tetrasomía parcial del cromosoma 22 y el síndrome de Emanuel (OMIM 609029), provocado por una segregación desequilibrada de la translocación t(11;22)(q23;q11.2). También la región proximal del brazo largo del cromosoma 15 es rica en LCRs (BP1 a BP6) que favorecen la formación de microdeleciones y microduplicaciones recurrentes de diferentes tamaños y relacionadas con una amplia variedad de fenotipos del neurodesarrollo y psiquiátricos. Entre estas alteraciones, se incluyen CNVs 15q11.2 (BP1-BP2) (caracterizadas por expresividad variable (autismo, retraso del desarrollo, retraso motor y del lenguaje, problemas del comportamiento y epilepsia) y penetrancia incompleta) (Burnside et al. 2011; Vanlerberghe et al. 2015), la microdelección 15q11-q13 (causante de los síndromes de Prader-Willi y Angelman) y su microduplicación recíproca (también relacionada con manifestaciones fenotípicas variables como hipotonía, autismo, retraso del desarrollo, problemas de aprendizaje, convulsiones y dismorfismo menor y caracterizada por penetrancia incompleta) (Al Ageeli et al. 2014; Kalsner y Chamberlain 2015) y CNVs 15q13.3 de diferentes tamaños, resultantes de la combinación de las distintas LCRs presentes en dicha región (BP3-BP5 y CHRNA7-LCR-BP5) (Gillentine y Schaaf 2015). De acuerdo con esto, hemos detectado algunas de estas CNVs 15q proximales en varios de nuestros pacientes (**ARTÍCULOS I y VII**) y, aunque el hecho de que la mayoría de ellas presentan expresividad variable y penetrancia incompleta que dificultan el asesoramiento genético familiar (De Wolf et al. 2013), se consideraron clínicamente relevantes, con excepción de las ganancias del número de copias restringidas al locus *CHRNA7* (*cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7*; OMIM 118511) que, en base a recomendaciones de la literatura (Szafranski et al. 2010; Gillentine y Schaaf 2015), se incluyeron en la categoría de "inciertas, posiblemente patogénicas" (ver más adelante en esta Discusión). En los **ARTÍCULOS I y VII** puede encontrarse la relación de pacientes con

desequilibrios cromosómicos recurrentes mediados por LCRs identificados en nuestros pacientes de las cohortes de DI y de TEA, respectivamente. Además, presentamos las descripciones clínicas detalladas de algunos de estos pacientes en el **ARTÍCULO II** [microdelección y microduplicación 3q29; (Quintela et al. 2015b)] y en el **ARTÍCULO IV** [microduplicación 16p13.11p12.3; (Quintela et al. 2015e)].

Al igual que las LCRs/SDs, secuencias altamente repetitivas -entre las que se incluyen los retrovirus endógenos humanos (HERVs; del inglés *Human Endogenous RetroViruses*)- incrementan la inestabilidad genómica local y favorecen la formación de microdeleciones y microduplicaciones recíprocas a través de eventos de NAHR [revisado por (Chen et al. 2014)]. Recientemente, Shuvarikov y col. (2013) descubrieron una delección 3q13.2-q13.31 recurrente (Shuvarikov et al. 2013; Campbell et al. 2014), causante de un fenotipo caracterizado, principalmente, por retraso cognitivo, motor y del lenguaje e hipotonía (Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013). El análisis molecular de los puntos de rotura de esta delección reveló la presencia de elementos HERVs directamente orientados, de aproximadamente 5 kb y con más de un 95% de identidad de secuencia, que servirían de sustrato de eventos NAHR y favorecerían la formación de esta CNV recurrente (Shuvarikov et al. 2013; Campbell et al. 2014). El análisis molecular de la paciente ASD_53 [arr 3q13.2q13.31(112.144.081-115.514.432)x1 dn] reveló la presencia de una microdelección *de novo* cuyos puntos de rotura coincidían con los descritos previamente para esta delección 3q13.2-q13.31 recurrente; por ello, realizamos un análisis exhaustivo de su historia clínica y comparamos sus rasgos fenotípicos con los de pacientes de la literatura con deleciones 3q13.31. Esto nos permitió constatar que esta alteración se manifiesta, principalmente, en forma de RGD/DI/retraso cognitivo, retraso del lenguaje y motor, hipotonía muscular, TEA, problemas del comportamiento y crecimiento postnatal anómalo, así como destacar algunos rasgos adicionales, presentes en nuestra paciente, como trastorno de ansiedad, comportamientos disruptivos y de ingesta compulsiva y alteraciones del sueño [**ARTÍCULO VIII**; (Quintela et al. 2015g)]. Entre los genes incluidos en la microdelección 3q13.2-q13.31 recurrente, *DRD3* (*dopamine receptor D3*; OMIM 126451) y *ZBTB20* (*zinc finger and BTB domain containing 20*; OMIM 606025) destacan como potenciales candidatos para explicar los rasgos fenotípicos centrales de los pacientes que la portan. Ambos genes han sido propuestos para explicar los trastornos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos (Shimojima et al. 2009; Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013; Vuillaume et al. 2013; Lowther et al. 2014; Rasmussen et al. 2014), así como las malformaciones cerebrales (Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013) y el crecimiento postnatal anómalo (Molin et al. 2012; Vuillaume et al. 2013; Karavitakis et al. 2014), mientras que *DRD3* podría también favorecer la aparición de hipotonía muscular (Shimojima et al. 2009; Shuvarikov et al. 2013). Otros genes del intervalo delecionado que podrían contribuir a la definición de estas manifestaciones fenotípicas incluyen: *CCDC80* [hipotonía muscular y anomalías del crecimiento (Karavitakis et al. 2014)], *BOC* [hipotonía muscular (Shimojima et al. 2009; Shuvarikov et al. 2013; Karavitakis et al. 2014) y agenesia del cuerpo calloso (Shuvarikov et al. 2013)] y *GAP43* [hipotonía muscular (Shuvarikov et al. 2013), agenesia del cuerpo calloso (Molin et al. 2012; Shuvarikov et al. 2013; Vuillaume et al. 2013) y fenotipos del neurodesarrollo y psiquiátricos (Molin et al. 2012; Gimelli et al. 2013; Vuillaume et al. 2013; Lowther et al. 2014)] [**ARTÍCULO VIII**; (Quintela et al. 2015g)].

Los reordenamientos genómicos causantes de trastornos del neurodesarrollo pueden también ocurrir en un locus único, variar en tamaño y diferir en sus puntos de rotura, dando

lugar a las denominadas CNVs no recurrentes (Zhang et al. 2009a). Este es el caso de las microdeleciones 2q22.3q23.3 y 8q21.11q21.13 detectadas en nuestra cohorte de DI (Perez-Gay et al. 2013; Quintela et al. 2015c):

El síndrome de la microdeleción 2q23.1 o DI autosómica dominante 1 (MRD1; OMIM 156200) está causado por mutaciones o alteraciones cromosómicas estructurales heterocigotas que afectan al gen *MBD5* (*methyl-CpG-binding domain protein 5*; OMIM 611472). Dentro de la definición del síndrome de la microdeleción 2q23.1 se han descrito desequilibrios genómicos de tamaño y puntos de rotura muy variables y, si bien la mayoría de los rasgos clínicos son comunes, existe también heterogeneidad fenotípica entre los pacientes. Los rasgos clínicos más frecuentes incluyen DI profunda, TEA, TDAH, retraso motor, afectación grave del lenguaje, retraso en el crecimiento postnatal, obesidad y epilepsia, además de un fenotipo craneofacial distintivo y anomalías esqueléticas, como braquidactilia generalizada (Dekaan y Klein 1968; Vissers et al. 2003; Koolen et al. 2004; de Vries et al. 2005; Wagenstaller et al. 2007; Jaillard et al. 2009; Pinto et al. 2010; van Bon et al. 2010; Williams et al. 2010b; Chung et al. 2011; Talkowski et al. 2011; Cukier et al. 2012; Chung et al. 2012; Ladha 2012; Motobayashi et al. 2012; Noh y Graham 2012; Talkowski et al. 2012; Bonnet et al. 2013; Du et al. 2014; Mullegama et al. 2014). Nuestro paciente ID_567 [arr 2q22.3q23.3(148.173.639-151.159.692)x1 dn], un varón de 11 años con DI profunda, convulsiones, rasgos dismórficos y anomalías esqueléticas, fue diagnosticado con el síndrome de la microdeleción 2q23.1 gracias a la detección de una deleción *de novo* en la región 2q22.3-q23.3 que afecta a los genes *ACVR2A*, *ORC4*, *MBD5*, *EPC2*, *KIF5C*, *MIR1978*, *LYPD6B*, *LYPD6* y *MMADHC* (Perez-Gay et al. 2013). En la región 2q22.3-q24.2 se han identificado diversas microdeleciones y microduplicaciones; no obstante, no se encuentran flanqueadas por duplicaciones segmentarias por lo que no parece que el mecanismo de NAHR esté explicando su formación (Jaillard et al. 2009). Se ha sugerido que otros mecanismos, como FoSTes/MMBIR, podrían favorecer la aparición de alteraciones cromosómicas 2q23 (Motobayashi et al. 2012). El gen *MBD5* se presenta como el candidato más probable para explicar el fenotipo de los pacientes con el síndrome de la microdeleción 2q23.1. La proteína MBD5 (*methyl CpG binding domain protein 5*) se expresa en neuronas y tiene funciones potenciales en la regulación de la expresión génica. Por otro lado, su dominio de unión metilo (MBD) presenta gran homología con el gen *MECP2*, que cuando está mutado o delecionado es causante del síndrome de Rett (Amir et al. 1999; Jaillard et al. 2009) y cuando está duplicado, da lugar al síndrome de la duplicación MECP2 [revisado por (Van Esch 2012)]. Aunque estudios *in vitro* realizados en ratones parecen indicar que la proteína codificada por *MBD5* en realidad no se une a secuencias metiladas del ADN, sí parece tener un papel en la formación y/o función de la heterocromatina, gracias a la asociación de esta con el dominio MBD (Laget et al. 2010). En este sentido, algunos autores han propuesto que esta unión podría tener lugar mediante la formación de un complejo proteico, ya que el dominio MBD interactúa directamente con la proteína codificada por *MEF2C* (*myocyte enhancer-binding factor 2C*; OMIM 600662), que juega un papel crucial en el desarrollo, la neurogénesis y la regulación de la expresión de genes neuronales implicados en la formación de circuitos neuronales y funciones sinápticas (Talkowski et al. 2011). Además, la haploinsuficiencia del gen *MEF2C*, asociada a la microdeleción 5q14.3, es causa de TEA, DI profunda, convulsiones e hipotonía, un fenotipo similar al de la microdeleción en *MBD5*. Así, ambos loci podrían participar en la misma ruta de señalización regulando la expresión de genes del neurodesarrollo (Talkowski et al. 2011; Du et al. 2012; Ladha 2012). Alternativamente, se ha sugerido que MBD5 podría actuar asociándose con una histona deacetilasa, ya que proteínas de la familia MBD pueden regular represión mediante su unión a complejos HDAC (Du et al.

2012). Estudios funcionales llevados a cabo en ratones también han aportado evidencias de la importancia de *MBD5* en el neurodesarrollo, pues su alteración provocó la aparición de rasgos fenotípicos característicos del síndrome de la microdeleción 2q23.1 en humanos, como retraso en el crecimiento y reducción del tamaño del cerebro (Du et al. 2012) o comportamiento social alterado, daño cognitivo y anomalías motoras y craneofaciales, además de la exhibición de déficits funcionales en las neuronas corticales (Camarena et al. 2014; Walz y Young 2014).

El síndrome de la microdeleción 8q21.11 (OMIM 614230) es también un trastorno genómico causado por microdeleciones solapantes de tamaños variables (entre 0,66 y 13,55 Mb) localizadas en la banda cromosómica 8q21.11 (Palomares et al. 2011). La detección de la microdeleción 8q21.11q21.13 en nuestro paciente ID_474 [arr 8q21.11q21.13(74.834.763-81.904.679)x1 no mat] y su análisis fenotípico detallado nos permitió verificar la presencia de la mayoría de los rasgos previamente descritos; es decir, DI, dismorfismo facial leve y anomalías de dedos de manos y pies, problemas de crecimiento y del equilibrio y anomalías oftalmológicas. No obstante, la apariencia global de nuestro paciente, especialmente su cara alargada más que redondeada, sus orejas (aunque de implantación baja) prominentes pero no rotadas posteriormente y la ausencia de puente nasal ancho y de pliegues epicánticos, le confieren un fenotipo facial similar sólo a un subgrupo de los pacientes descritos hasta la fecha. De los 23 genes delecionados en nuestro paciente, *ZFHX4* (*zinc finger homeobox 4*; OMIM 606940) merece especial atención por su potencial contribución al fenotipo, en particular a ptosis aislada bilateral congénita (McMullan et al. 2002), un rasgo también presente en nuestro paciente. Además, la identificación de una deleción monogénica *de novo* afectando a los últimos 7 exones de este gen en un paciente con retraso del desarrollo, macrocefalia, ventriculomegalia, hipermetropía, infecciones recurrentes y dismorfismo (Vulto-van Silfhout et al. 2013), lo situaría como un nuevo gen candidato de DI y anomalías congénitas. No obstante, no podemos descartar la contribución de otros factores, tanto genéticos y epigenéticos como ambientales, siendo necesarios estudios adicionales para poder determinar (o descartar) la contribución individual de cada uno de los genes delecionados al fenotipo [**ARTÍCULO III**; (Quintela et al. 2015c)].

Los reordenamientos cromosómicos incluidos en esta primera categoría de CNVs clínicamente relevantes se caracterizan, frecuentemente, por presentar expresividad variable y penetrancia incompleta (Malhotra y Sebat 2012; Rosenfeld et al. 2012; Kirov et al. 2013), lo cual dificulta considerablemente su interpretación clínica (Hehir-Kwa et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013) y complica la tarea del consejo genético familiar. Esto es especialmente complejo cuando estas CNVs son heredadas de un progenitor no afecto o con una evaluación clínica incompleta o no disponible. En nuestro estudio, pudimos completar el estudio genético familiar en 22 de los pacientes con trastornos genómicos conocidos (18 en la cohorte de DI y 4 en la cohorte de TEA), encontrándonos que 13 (59,1%; 55,6% en DI y 75% en TEA) de ellos habían heredado la CNV de uno de sus progenitores (11/13 de la madre y 2/13 del padre). Las causas de esta heterogeneidad clínica no están completamente definidas, habiéndose propuesto la hipótesis de múltiple evento como una de las explicaciones más plausibles (Girirajan et al. 2010). En este sentido, 18,2% y 45,4% de los pacientes de la cohorte de DI y de la cohorte de TEA con trastornos genómicos conocidos presentaron, respectivamente, al menos una CNV exónica rara adicional en su genoma (**ARTÍCULOS I y II**). Tampoco podemos descartar la existencia de variantes genéticas adicionales no detectadas por *microarrays* pero sí por las nuevas técnicas de secuenciación masiva, como SNVs o *indels*, así como la contribución de factores epigenéticos y/o ambientales en la modificación del fenotipo de estos pacientes.

(b) *Reordenamientos cromosómicos teloméricos* (3,2% y 2,4% de las CNVs exónicas raras detectadas en los pacientes de las cohortes de DI y TEA, respectivamente). En esta categoría se incluyen alteraciones genéticas con importantes consecuencias fenotípicas, debido a que los extremos de los cromosomas son relativamente ricos en genes (Saccone et al. 1992). Algunos de estos desequilibrios son bastante comunes, como la monosomía 1p36 (OMIM 607872) que se ha identificado en ~1% de los pacientes con DI idiopática (Battaglia et al. 2008) y que nosotros hemos detectado en la paciente ID_127 ([arr 1p36.33(849.466-2.098.337)x1 no mat,4q32.1(156.759.265-157.037.360)x1 mat]; **ARTÍCULO I**) o el síndrome de Pheland-McDermid (OMIM 606232) causado por la microdeleción 22q terminal implicando al gen *SHANK3* (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*; OMIM 606230), identificada en los pacientes ID_350 ([arr 22q13.31q13.33(48.160.896-51.183.870)x1]; **ARTÍCULO I**) y ASD_62 ([arr 19q13.43(57.561.530-58.956.888)x3 dn,22q13.32q13.33(48.425.456-51.197.838)x1 dn]; **ARTÍCULO VII**). Los paneles de SNPs (igual que los *arrays* de CGH) no son apropiados para evaluar el riesgo de recurrencia en posteriores embarazos de las parejas con hijos con reordenamientos teloméricos, debido a la imposibilidad de estas tecnologías para detectar reordenamientos genómicos equilibrados. Por ello, en estas situaciones, la prueba genética a los padres debe contemplar técnicas complementarias, capaces de detectar translocaciones sin pérdida ni ganancia de material genómico (como la FISH o el cariotipo convencional) (**ARTÍCULOS I y II**).

(c) *CNVs patogénicas de diferente tamaño* (7,0% y 3,5% de las CNVs exónicas raras detectadas en los pacientes de las cohortes de DI y TEA, respectivamente). Como ejemplos ilustrativos de pacientes con CNVs de esta categoría, hemos presentado la historia clínica detallada de los pacientes ID_191 (y su familia) e ID_533 [**ARTÍCULO V**; (Quintela et al. 2015d)] y del paciente ASD_109 [**ARTÍCULO IX**; (Quintela et al. 2015f)]:

El paciente ID_191, su hermana [arr 4q13.1q13.2(65.736.024-69.582.428)x1 mat] (ambos con DI leve y TDAH) y su madre (DI leve) y la paciente ID_533 [arr 4q13.2q13.3(68.207.272-75.021.494)x1 dn,11q24.2(126.463.132-126.677.128)x3 mat] (DI leve, problemas de comportamiento, baja estatura y dismorfismo facial menor) presentaron deleciones parcialmente solapantes en la región cromosómica 4q13. La revisión de la literatura y la comparación de los hallazgos moleculares y clínicos previos (Assawamakin et al. 2012; Matoso et al. 2013; Shimada et al. 2013; Utine et al. 2014) con los de nuestros pacientes nos permitieron identificar una región mínima crítica, localizada en la banda cromosómica 4q13.2 y que incluye 17 genes. Entre ellos, destacamos el gen *UBA6* (*ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6*; OMIM 611361), implicado en el desarrollo embrionario de ratones, como el principal candidato para explicar el fenotipo de nuestros pacientes, específicamente DI leve y TDAH. Evidencias funcionales apoyan esta hipótesis, habiéndose encontrado que ratones deficientes en *Uba6* presentan problemas de aprendizaje y memoria, interacción social disminuida, actividad metabólica incrementada consistente con hiperactividad, ansiedad y problemas de comunicación (Lee et al. 2013a; Lee et al. 2015), además de tamaño significativamente reducido y letalidad postnatal incrementada en comparación con ratones control, defectos morfológicos en el hipocampo y la amígdala y reducida densidad de espinas dendríticas (Lee et al. 2013a) [**ARTÍCULO V**; (Quintela et al. 2015d)].

El paciente ASD_109 [arr Xp22.31(6.446.579-8.135.644)x2 mat,6q14.1q15(83.648.997-88.613.065)x1 no mat], un varón de 8 años con TEA grave, ausencia de lenguaje oral y rasgos faciales dismórficos, presentó una microdeleción 6q14.1q15 de 4,96 Mb que afecta a 31

genes. Entre ellos, destacamos *PGM3* (*phosphoglucomutase 3*) (Zhang et al. 2014), *PRSS35* (*protease, serine, 35*), *SNAP91* (*synaptosomal associated protein, 91kDa*) (Letra et al. 2010; Goes et al. 2012), *RIPPLY2* (*rippy transcriptional repressor 2*) (Biris et al. 2007; Chan et al. 2007; Morimoto et al. 2007; McInerney-Leo et al. 2014), *MRAP2* (*melanocortin 2 receptor accessory protein 2*) (Asai et al. 2013; Liu et al. 2013; Sebag et al. 2013), *SYNCRIP* (*synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein*) (Rauch et al. 2012; Pinto et al. 2014), *SNX14* (*sorting nexin 14*) (Pinto et al. 2014) y *HTR1E* (*5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1E, G protein-coupled*) (Lasky-Su et al. 2008; Oades et al. 2008; Amin et al. 2009; Baca-García et al. 2010; Nishioka et al. 2013) como candidatos potenciales para explicar su fenotipo. Además, el paciente portó una ganancia Xp22.31 de herencia materna y significado clínico incierto, discutida más adelante en este capítulo y que también podría estar implicada en sus manifestaciones clínicas [**ARTÍCULO IX**; (Quintela et al. 2015f)].

(d) *CNVs monogénicas en genes de DI/TEA* (2,2% y 3,5% de las CNVs exónicas raras detectadas en los pacientes de las cohortes de DI y TEA, respectivamente). Dentro de esta categoría se identificaron deleciones en los genes *NRXN1*, *AUTS2*, *CACNA1C*, *SOX5* y *RPS6KA3* y una ganancia en el gen *GRIA3*, todos ellos conocidos por su implicación en fenotipos del neurodesarrollo:

El gen *NRXN1* (*neurexin I*; OMIM 600565), localizado en el cromosoma 2p16.3 y perteneciente a la familia de las neurexinas -proteínas de adhesión celular presinápticas-, se ha encontrado alterado en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos, como TEA, DI, problemas del comportamiento, ansiedad, trastorno bipolar y esquizofrenia (Wisniowiecka-Kowalnik et al. 2010; Gregor et al. 2011; Soysal et al. 2011; Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Imitola et al. 2014; Roberts et al. 2014; Vinas-Jornet et al. 2014; Agha et al. 2015; Lowther et al. 2016; Oikonomakis et al. 2016), hipotonía muscular y epilepsia (Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Lowther et al. 2016) y, menos frecuentemente, dismorfismo facial y malformaciones congénitas (Schaaf et al. 2012; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016). También se han identificado deleciones en este gen en población control y en progenitores y hermanos levemente o no afectados (Schaaf et al. 2012; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016); una penetrancia incompleta que podría explicarse por la acción de factores adicionales, incluyendo segundos eventos CNVs (Soysal et al. 2011; Bena et al. 2013; Curran et al. 2013; Dabell et al. 2013; Vinas-Jornet et al. 2014; Lowther et al. 2016). Los pacientes ASD_229 [arr 2p23.1p22.3(31.565.860-33.000.665)x3,2p16.3(50.888.428-52.549.542)x1] y ASD_221 [arr 2p16.3(51.027.613-51.161.647)x1] presentaron deleciones exónicas raras en *NRXN1*; la paciente ASD_229 portó una ganancia 2p23.1p22.3 adicional de significación incierta pero que, siguiendo este modelo de múltiple evento, podría también participar en la definición de su fenotipo. Un estudio reciente realizado con 19.263 pacientes con DI/RGD y 15.264 controles concluyó, además, que la penetrancia de las deleciones *NRXN1* que afectan al extremo 5' es mayor que la de las deleciones 3'; hipótesis que ha sido explicada por la acción potencial del ARNm no codificante *AK127244* (Lowther et al. 2016), ubicado justo adyacente al promotor de *NRXN1-α* y que ha sido encontrado delecionado en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y psiquiátricos (Walker y Scherer 2013; Duong et al. 2015). Apoyando esta hipótesis, las dos deleciones identificadas en nuestras muestras se localizan en el extremo 5' del gen y, en el caso de la paciente ASD_229, se extiende a la región promotora e incluye a *AK127244* (Material Suplementario del **ARTÍCULO VII**).

El gen *AUTS2* (*autism susceptibility candidate 2*; OMIM 607270) se ubica en la banda cromosómica 7q11.22, tiene expresión predominante en el cerebro (Oksenberg y Ahituv 2013) y se ha encontrado alterado por variantes estructurales raras en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (de la Barra et al. 1986; Sultana et al. 2002; Kalscheuer et al. 2007; Bakkaloglu et al. 2008; Glessner et al. 2009; Huang et al. 2010; Ben-David et al. 2011; Girirajan et al. 2011; Nagamani et al. 2012; Talkowski et al. 2012; Beunders et al. 2013; Jolley et al. 2013; Tropeano et al. 2013; Amarillo et al. 2014; Beunders et al. 2014; Fan et al. 2015; Liu et al. 2015; Schneider et al. 2015). Las manifestaciones clínicas y la gravedad de las mismas son variables, habiéndose descrito que dependen de la localización de la variante, con un mayor grado de afectación cuando se altera el extremo 3' del gen, donde se concentran la mayoría de sus exones (Beunders et al. 2013). De acuerdo con esto, detectamos una microdelección que afecta a los últimos 14 exones de *AUTS2* en la paciente ASD_60 [arr 7q11.22(69.914.440-70.297.558)x1 no mat] con un fenotipo neurocognitivo y del comportamiento y manifestaciones clínicas de mayor gravedad (TEA grave, DI moderada a grave, ausencia total de lenguaje expresivo, hipotonía generalizada y anomalías oftalmológicas) (Paciente 2; **ARTÍCULO X**) que las de pacientes previamente descritos en la literatura con reordenamientos 5' que no alteran la secuencia del gen (Beunders et al. 2013).

El gen *CACNA1C* (*calcium channel, voltage-dependent, 1 type, alpha-1c subunit*; OMIM 114205), implicado en el síndrome de Brugada (OMIM 611875) y en el síndrome de Timothy (OMIM 114205) cuando está mutado, juega papeles importantes en el desarrollo dendrítico, la supervivencia neuronal, la plasticidad sináptica, la memoria, el aprendizaje y el comportamiento [revisado por (Bhat et al. 2012)]. Tal y como se ha sugerido en la literatura (Abdelmoity et al. 2011; Vargas et al. 2012; Fanizza et al. 2014), la alteración de dosis de este gen parece generar fenotipos diferentes a los descritos para las variantes puntuales; de hecho, se ha encontrado deleciónado en pacientes con trastornos del neurodesarrollo y del comportamiento (Velinov et al. 2008; Rooryck et al. 2009; Macdonald et al. 2010; Abdelmoity et al. 2011; Madrigal et al. 2012; Vargas et al. 2012; Thevenon et al. 2013; Fanizza et al. 2014). Reforzando esta hipótesis, detectamos una deleción *CACNA1C* intragénica de 204,5 kb en nuestro paciente ID_45 [arr 12p13.33(2.366.516-2.571.012)x1], quien presentó un fenotipo caracterizado por DI síndrónica, TDAH y problemas de comportamiento (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

El gen *SOX5* (*SRY-box 5*; OMIM 604975), localizado en la región cromosómica 12p12.1, pertenece a la familia SOXD (sex determining region (SRY)-related HMG-box) de factores de transcripción implicados en diversas funciones del desarrollo, incluyendo formación del cartílago (Lefebvre et al. 1998; Smits et al. 2001; Ikeda et al. 2002; Lefebvre 2010; Aza-Carmona et al. 2011), neurogénesis (Lefebvre 2010) y desarrollo del sistema nervioso (Kwan et al. 2008; Lai et al. 2008; Lefebvre 2010). La revisión de la literatura (Lamb et al. 2012; Lee et al. 2013b; Schanze et al. 2013) y el hallazgo en nuestra cohorte de DI del paciente ID_6 [arr 12p12.1(23.769.086-24.262.524)x1 dn,16p13.11p12.3(15.286.149-18.771.863)x3 mat], con RGD, problemas de comportamiento y rasgos dismórficos menores y una deleción 12p12.1 *de novo* que afecta exclusivamente a *SOX5* revelan que las alteraciones en este gen se manifiestan, principalmente, en forma de RGD/DI, retraso del habla y del lenguaje y rasgos dismórficos [**ARTÍCULO IV**; (Quintela et al. 2015e)]. Es importante destacar que, además de las deleciones restringidas a *SOX5*, también se han publicado descripciones clínicas de pacientes con trastornos del neurodesarrollo y deleciones de mayor tamaño que incluyen genes adicionales (Lamb et al. 2012; Lee et al. 2013b; Schanze et al. 2013); este es el caso de nuestro paciente ID_358 [arr 12p12.2p11.23(21.000.550-27.266.871)x1 dn], un niño de 11

meses con RGD leve, hipotelorismo, labio superior fino y retraso ponderal perinatal y una delección 12p12.2p11.23 *de novo* de 6,3 Mb de longitud y que afecta a 38 genes, incluidos *KRAS* (*KRAS proto-oncogene, GTPase*; OMIM 190070; causante de DI autosómica dominante, como parte del síndrome cardiofaciocutáneo (OMIM 615278), cuando está mutado) y *SOX5* (**ARTÍCULO I**; CNV patogénica, Categoría C).

El gen *RPS6KA3* (*ribosomal protein S6 kinase, 90-KD, 3*; OMIM 300075), localizado en el cromosoma X y causante del síndrome de Coffin-Lowry (CLS; OMIM 303600) (Delaunoy et al. 2001; Zeniou et al. 2002; Martínez-Garay et al. 2003; Nakamura et al. 2005; Delaunoy et al. 2006; Wang et al. 2006; Marques Pereira et al. 2007; Jurkiewicz et al. 2010; Thorson et al. 2010; Rojnueangnit et al. 2013; Nishimoto et al. 2014), se encontró parcialmente delecionado en la paciente ID_166 [arr Xp22.12(20.173.856-20.360.913)x1 no mat], quien presentó un fenotipo CLS típicamente descrito en varones, incluyendo los episodios de caída repentina inducidos por estímulo. Aproximadamente un 10-14% de los pacientes con el CLS presentan estas caídas; de estos, la mayoría son varones mientras que sólo aproximadamente 1/3 son mujeres (Hahn y Hanauer 2012), como nuestra paciente [**ARTÍCULO VI**; (Quintela et al. 2015a)].

Finalmente, detectamos una ganancia monogénica Xq25 de 281,5 kb que duplica 14 exones de *GRIA3* en el ADN de la muestra ID_401 [arr Xq25(122.312.033-122.593.583)x2], un varón de 6 años con DI, retraso del lenguaje y aprendizaje, TDAH, posturas distónicas y lóbulo de la oreja bífido. El gen *GRIA3* (*glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3*; OMIM 305915) pertenece a la clase de receptores de glutamato AMPA, importantes en la transmisión sináptica y en procesos implicados en memoria y aprendizaje (Gecz et al. 1999). Se han encontrado desde SNVs (Wu et al. 2007; Philips et al. 2014) hasta variantes estructurales, incluyendo translocaciones (Gecz et al. 1999), delecciones (Wu et al. 2007) y ganancias (Jacquemont et al. 2006; Chiyonobu et al. 2007; Bonnet et al. 2009; Guilmatre et al. 2009; Philippe et al. 2013) afectando al gen *GRIA3* en pacientes con un fenotipo sindrómico de DI (OMIM 300699) (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

CNVs de significado clínico incierto. Esta segunda categoría de CNVs representa un grupo amplio (50,0% y 64,7% del total de las CNVs exónicas raras detectadas en nuestras cohortes de DI y de TEA, respectivamente) en el que se englobaron aquellas variantes con un impacto clínico indeterminado en el momento de su clasificación. Estas alteraciones de significado desconocido se subclasificaron en (a) *posiblemente patogénicas*, (b) *no subclasificadas* y (c) *posiblemente benignas*, siguiendo los criterios definidos en los apartados "Material y Métodos" de los **ARTÍCULOS I** y **VII**. A continuación, se discute la potencial relevancia clínica de algunas de las variantes inciertas pertenecientes a la subcategoría (a) *posiblemente patogénicas*, que representaron un 8,1% y un 9,4% del total de las CNVs exónicas raras detectadas en nuestras cohortes de DI y de TEA, respectivamente:

El paciente ID_295 [arr 1q41(218.432.883-220.940.873)x1 mat], de 15 años de edad y con un fenotipo central caracterizado por DI leve e hiperlaxitud articular, presentó una pérdida del número copias heredada de su madre en la región cromosómica 1q41, de 2,5 Mb de longitud y que afecta a los genes *RRP15*, *TGFB2*, *LYPLAL1*, *SLC30A10*, *EPRS*, *BPNT1*, *IARS2*, *MIR215*, *MIR194-1*, *RAB3GAP2*, *MIR664*, *SNORA36B*, *AURKAPS1*, *MARK1*, *C1orf115* y *MOSC2*. La región mínima de solapamiento entre esta alteración y las delecciones de otros pacientes con retraso del desarrollo de la literatura (Lindsay et al. 2012; Fontana et al. 2014) afecta a los genes *RRP15*, *TGFB2* y *LYPLAL1*. Además, destacan los genes *RAB3GAP2* (*RAB3 GTPase-activating protein, noncatalytic subunit*; OMIM 609275), por ser

causa de DI autosómica recesiva y *MARK1* (*MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1*; OMIM 616511), propuesto como un gen de susceptibilidad al autismo (Maussion et al. 2008) e importante en la morfogénesis de las espinas dendríticas en las neuronas del hipocampo (Wu et al. 2012) (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

En la muestra ID_409 [arr 2q12.2q12.3(106.853.263-108.440.756)x1], perteneciente a un varón de 12 años con DI leve y sin TEA, identificamos una delección 2q12.2q12.3 de 1,6 Mb de longitud y que incluye a los genes *PLGLA*, *RGPD3*, *ST6GAL2* y *LOC729121* (**ARTÍCULO I**). Se trata de una de las 4 posibles CNVs recurrentes, flanqueadas por LCRs y mediadas por NAHR, descubiertas en la región cromosómica 2q12.2q12.3 (Dittwald et al. 2013). Magri y col. (2010) encontraron que la frecuencia de las CNVs (deleciones y sus duplicaciones recíprocas) 2q12.2q12.3 era aproximadamente 10 veces superior en pacientes con esquizofrenia que en controles, por lo que sugirieron que se trataría de un potencial locus de susceptibilidad a este trastorno, al tiempo que advertían de la necesidad de más datos para considerarla definitivamente patogénica. Esta misma delección también ha sido identificada en pacientes con trastornos del neurodesarrollo, tanto en la literatura científica (Dittwald et al. 2013) como en bases de datos de pacientes. Así, Dittwald y col. (2013) encontraron esta misma alteración en 3 muestras referidas al laboratorio para el análisis de CNVs; esto es, una mujer de 4 años con retraso del desarrollo y dos fetos (información fenotípica no disponible) que habían heredado la delección de uno de sus progenitores, en ambos casos identificados como no afectos (Dittwald et al. 2013). En la base de datos DECIPHER está también recopilada la información fenotípica de pacientes portadores de la delección recurrente 2q12.2q12.3 y, en ocasiones, sus datos de herencia, si bien no existe consenso en cuanto a su patogenicidad, tal y como se refleja a continuación: DECIPHER 289698 (fenotipo de DI; delección de herencia desconocida; considerada posiblemente patogénica), DECIPHER 287999 (DI, microcefalia, edema y distrofia de conos y bastones; heredada de la madre, constitutiva en la madre; posiblemente patogénica), DECIPHER 289603 (DI y psicosis; herencia desconocida; posiblemente patogénica), DECIPHER 289881 (autismo, debilidad muscular; heredada del padre, constitutiva en el padre; posiblemente patogénica), DECIPHER 290425 (cataratas, microcefalia y DI; herencia desconocida; posiblemente patogénica), DECIPHER 306637 (autismo; heredada del padre, constitutiva en el padre; posiblemente benigna) DECIPHER 270580 (daño cognitivo; heredada de padre normal; patogenicidad incierta), DECIPHER 278673 (neuroblastoma localizado, RGD leve, macrocefalia al nacimiento y estatura alta; heredada de la madre, constitutiva en la madre; incierta) DECIPHER 273729 (sin datos fenotípicos; herencia desconocida; incierta), DECIPHER 274933 (anomalía de la cavidad nasal, dolores de cabeza, convulsiones, retraso del desarrollo del habla y del lenguaje, afectación de la memoria y apnea del sueño; heredada de la madre, constitutiva en la madre; incierta) y DECIPHER 268346 (anomalía de la frente, criptorquidismo, macrocefalia, autismo y DI; heredada de un padre con similar fenotipo; incierta).

La muestra ID_210 [arr 2q36.3(230.742.418-230.846.708)x1], un niño de 17 años con DI leve, dificultades sociales y de atención graves y trastorno del comportamiento, presentó una delección 2q36.3 de 104 kb, cuyos extremos interrumpen a los genes *TRIP12* y *FBXO36*. Aunque se necesitarán más estudios para poder afirmar la patogenicidad de esta variante, el hallazgo de deleciones y mutaciones puntuales de pérdida de función en el gen *TRIP12* (*thyroid hormone receptor interactor 12*; OMIM 604506) en pacientes con trastornos del neurodesarrollo (Doco-Fenzy et al. 2008; Iossifov et al. 2012; O'Roak et al. 2014; Pinto et al. 2014; Sanders et al. 2015), la función de la proteína que codifica y las evidencias

experimentales discutidas en el Material Suplementario del **ARTÍCULO I** (Kajiro et al. 2011; Gudjonsson et al. 2012; Poulsen et al. 2012) convierten a este gen en un potencial candidato para explicar el fenotipo de nuestro paciente.

La paciente ID_354 [arr 3q29(196.535.850-197.660.039)x3 mat], una niña de 12 años con hipotonía en edades tempranas y que posteriormente presentó dificultades de aprendizaje, de motricidad y en las relaciones sociales y un diagnóstico de DI, portó una ganancia 3q29 de herencia materna, de 1,12 Mb de longitud (**ARTÍCULO I**) y que solapa parcialmente con la región del síndrome de la microduplicación 3q29 (OMIM 611936). Esta alteración se consideró posiblemente patogénica en base a que entre los genes duplicados (*PAK2*, *SENP5*, *NCBP2*, *LOC152217*, *PIGZ*, *MFI2*, *DLG1*, *BDHI*, *LOC220729*, *KIAA0226*, *MIR922*, *FYTTD1*, *LRCH3* y *IQCG*) se incluyen *PAK2* y *DLG1*, los candidatos más habitualmente propuestos para explicar los fenotipos asociados a los síndromes de microdelección/microduplicación 3q29 (Dimitratos et al. 1999; Caruana y Bernstein 2001; Willatt et al. 2005; Demyanenko et al. 2009; Kreis y Barnier 2009; Dasouki et al. 2013; Fernandez-Jaen et al. 2014) [ver Discusión del **ARTÍCULO II**; (Quintela et al. 2015b)].

En el ADN del paciente ID_237 [arr 4q31.23(148.694.448-149.325.972)x1], un niño de 17 años con DI y rasgos dismórficos, identificamos una pérdida del número de copias en la región 4q31.23. La potencial patogénicidad de esta variante viene determinada por el hecho de que interrumpe parcialmente a *NR3C2* (*nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2*; OMIM 600983), un gen al que se le ha prestado especial atención en diversos trastornos psiquiátricos (Xing et al. 2004; Ikeda et al. 2010) y que, además, se ha encontrado alterado por variantes *de novo*, tanto en el propio gen (Iossifov et al. 2012; De Rubeis et al. 2014) como en elementos reguladores potenciales próximos (Turner et al. 2016), en pacientes con TEA y deleciónado parcialmente, como en nuestro caso, en pacientes con fenotipos del neurodesarrollo de la base de datos ISCA (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

El paciente ASD_300 [arr 8p21.3(19.194.170-21.760.673)x1], un varón de 7 años perteneciente a la cohorte de TEA, presentó una deleción 8p21.3, de 2,6 Mb de longitud y que afecta a los genes *SH2D4A*, *CSGALNACT1*, *INTS10*, *LPL*, *SLC18A1*, *ATP6V1B2*, *LZTS1*, *LOC286114* y *GFRA2*. Tal y como se discute en el Material Suplementario del **ARTÍCULO VII**, esta deleción se consideró posiblemente patogénica en base a su tamaño, contenido génico y diversos hallazgos de la literatura que sugieren algunos genes candidato incluidos en este intervalo: *LZTS1* (*leucine zipper, putative tumor suppressor 1*; OMIM 606551), por su potencial actuación en la regulación del ciclo celular, guía y crecimiento axonal y/o migración neuronal (Kropp y Wilson 2012); *ATP6V1B2* (*ATPase, H⁺ transporting, lysosomal, 56/58-KD, V1 subunit B, isoform 2*; OMIM 606939), por encontrarse mutado en pacientes con el síndrome de Zimmermann-Laband 2 (Kortum et al. 2015) y *SLC18A1* (*solute carrier family 18 member A1*; OMIM 193002), porque varios estudios de ligamiento y de asociación caso-control lo han implicado en diversos trastornos psiquiátricos (Bly 2005; Chen et al. 2007; Lohoff et al. 2008; Tabares-Seisdedos y Rubenstein 2009; Lohoff 2010; Mas et al. 2013) y porque se ha encontrado asociación significativa entre la concentración de compuestos glutamatérgicos en el córtex cingulado anterior y el polimorfismo rs6586896, situado en este gen, en pacientes pediátricos con trastorno obsesivo compulsivo (Ortiz et al. 2015). No obstante, se necesitarán más estudios que permitan relacionar definitivamente la alteración genética detectada en nuestro paciente con el TEA.

El gen *CHRNA7* (*cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7*; OMIM 118511), localizado en el cromosoma 15q13.3, codifica la subunidad alfa 7 de los receptores

nicotínicos de acetilcolina, una familia de canales iónicos activados por ligando implicados en la regulación de neurotransmisores, con elevada expresión en cerebro -principalmente en el hipocampo- y cuya haploinsuficiencia se ha visto que predispone a fenotipos del neurodesarrollo y neuropsiquiátricos y a epilepsia [revisado por (Schaaf 2014; Gillentine y Schaaf 2015)]. También se han identificado pacientes con duplicaciones limitadas a este gen en la literatura [revisado por (Gillentine y Schaaf 2015)] y en las bases de datos de pacientes como ISCA o DECIPHER, siendo los defectos cognitivos (28,3%) y esquizofrenia (28,3%), seguido de TDAH (18,3%), trastorno del estado de ánimo (18,3%) y TEA (15%) las manifestaciones clínicas más prevalentes; otros rasgos, también relativamente frecuentes, incluyen hipotonía (11,7%), problemas del lenguaje (8,3%), convulsiones (6,7%), problemas neurológicos (5%) y rasgos dismórficos (5%) [revisado por (Gillentine y Schaaf 2015)]. No obstante, la significación clínica de esta duplicación es incierta debido, fundamentalmente, a que se ha identificado también en población control a frecuencias similares o superiores a las detectadas en pacientes (Kirov et al. 2013). En nuestro estudio, un total de 7 muestras [6 pertenecientes a la serie de DI (1,2%) y 1 a la de TEA (0,3%)] en el total de los 883 (0,8%) pacientes con genotipos que superaron el control de calidad presentaron ganancias de dosis en este gen (**ARTÍCULOS I y VII**). Entre los motivos que se han sugerido para explicar la reducida penetrancia y la expresividad variable de esta duplicación se incluyen cambios epigenéticos en el promotor de *CHRNA7* (Gillentine y Schaaf 2015) o la contribución de CNVs adicionales; este modelo de múltiple evento, de hecho, se ha encontrado en pacientes de la literatura (Leblond et al. 2012; Chilian et al. 2013) y podría aplicarse a dos de nuestras muestras de la cohorte de DI: El paciente ID_460 ([arr 10q22.2q22.3(75.498.936-79.284.250)x3,15q13.3(32.003.537-32.444.044)x3]; varón con DI y trastorno conductual y del sueño) presentó una duplicación adicional en el cromosoma 10q22.2q22.3 de 3,78 Mb y que afecta a 21 genes (*SEC24C, FUT11, CHCHD1, KIAA0913, NDST2, CAMK2G, C10orf55, PLAUI, VCL, AP3MI, ADK, MYST4, DUPD1, DUSP13, SAMD8, VDAC2, COMTD1, ZNF503, NCRNA00245, C10orf11 y KCNMA1*) (**ARTÍCULO I**), algunos de ellos implicados en DI (*ADK* en DI autosómica recesiva y *KAT6B* en DI autosómica dominante; en concreto en el síndrome Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson (Pinto et al. 2014). El paciente ID_469 ([arr 15q13.3(32.003.537-32.446.830)x3,15q24.3q25.1(78.232.021-78.586.944)x3]; varón con DI y TEA), por su parte, presentó otra variante de significado clínico incierto: una duplicación 15q24.3q25.1 de 354,92 kb que afecta a *LOC91450, TBC1D2B, SH2D7, CIB2, IDH3A, ACSBG1, DNAJA4 y WDR61* (**ARTÍCULO I**), entre los que se incluye *CIB2*, un gen sugerido como candidato a conferir susceptibilidad a los TEA (Prasad et al. 2012).

El paciente ASD_222 [arr 17p13.3(2.534.709-2.766.781)x3 no mat,18q23(76.772.006-77.045.710)x3 no mat] portó una ganancia no materna en el cromosoma 17p13.3 cuyo punto de rotura distal interrumpe al gen *PAFAH1B1* (también denominado *LIS1; platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha subunit*; OMIM 601545). Se trata de un niño de 5 años con TEA, una manifestación fenotípica descrita tanto en pacientes con duplicaciones multigénicas incluyendo este gen (Bi et al. 2009; Bruno et al. 2010), como en pacientes con ganancias *PAFAH1B1* monogénicas (Faletra et al. 2011) (Material Suplementario del **ARTÍCULO VII**).

La niña ID_486 [arr 11q22.3(10.8764.087-109.157.117)x3,19q13.32q13.33(47.678.453-48.404.515)x3], de 9 años y con DI, TEA y déficit visual con nistagmo congénito, presentó una ganancia 19q13.32q13.33 que abarca a los genes *SAE1, BBC3, MIR3190, MIR3191, CCDC9, PRR24, C5ARI, GPR77, DHX34, MEIS3, SLC8A2, KPTN, NAPA, ZNF541,*

GLTSCR1, *EHD2*, *GLTSCR2*, *SNORD23*, *SEPWI*, *TPRX1*, *CRX* y *SULT2A1* y que fue considerada posiblemente patogénica debido a que se han documentado deleciones en esta región en pacientes con trastornos del neurodesarrollo en la literatura (Leal et al. 2009; Castillo et al. 2014) y ganancias similares en pacientes con fenotipos del neurodesarrollo de las bases de datos ISCA y DECIPHER. La duplicación encontrada en nuestra paciente es rica en genes y algunos de ellos, *SAE1* (*SUMO1-activating enzyme, subunit 1*; OMIM 613294); *KPTN* (*kaptin (actin binding protein)*; OMIM 615620) y *SLC8A2* (*solute carrier family 8 (sodium-calcium exchanger), member 2*; OMIM 601901), han sido sugeridos como potenciales candidato para explicar fenotipos del neurodesarrollo (Leal et al. 2009). Estos y otros genes alterados en nuestra paciente (*NPASI*, *NAPA*, *ARHGAP35*, *SLC8A2*, *DHX34*, *MEIS3* y *ZNF541*) han sido también destacados por su expresión en parénquima cerebral, glía, corazón, tracto gastrointestinal y sistema musculoesquelético (Castillo et al. 2014) (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

La interrupción del gen *PTPRT* (*protein tyrosine phosphatase, receptor type*; OMIM 608712) en el cromosoma 20q12q13.11 se consideró la causa potencial del RGD moderado manifestado por la paciente ID_427 [arr 20q12q13.11(40.946.119-42.040.938)x3] en base a: (1) la identificación de varios pacientes DECIPHER con duplicaciones incluidas en la de nuestra paciente y que son consideradas posiblemente patogénicas; (2) un estudio de ligamiento que encontró asociación significativa entre la región en la que se ubica *PTPRT* y el TEA (Allen-Brady et al. 2009); (3) la detección de dos variantes heterocigotas en este gen en una familia con DI grave, problemas del comportamiento, microcefalia, y anomalías congénitas (Schuurs-Hoeijmakers et al. 2013); (4) evidencias funcionales que apuntan hacia un papel de *PTPRT* en la interacción social en ratones (Thirtamara Rajamani et al. 2015) y a su implicación, recientemente sugerida, en la regulación de la función sináptica y el desarrollo neuronal (Lee 2015) (Material Suplementario del **ARTÍCULO I**).

Como se comentó anteriormente en este capítulo, la riqueza en LCRs de la región cromosómica 22q11 la convierten en susceptible de eventos de NAHR que favorecen la formación de CNVs de diversos tamaños y localizaciones (Edelmann et al. 1999; Portnoi et al. 2005; Portnoi 2009). La mayoría de las aberraciones cromosómicas presentan un tamaño de aproximadamente 3 Mb (entre las LCR22s -A y -D), aunque también se han documentando reordenamientos de ~1,5 Mb (entre LCR22-A y LCR22-B), ~4 Mb (cuando intervienen las LCR22s -A y -E) y de ~6 Mb (desde la LCR22-A hasta la LCR22- G) (Ensenauer et al. 2003; Portnoi 2009) y casos con CNVs más atípicas, con puntos de rotura adyacentes a LCR22s alternativas o con otras localizaciones 22q11 (Fan et al. 2007; Fernandez et al. 2009; Shimojima et al. 2011; Li et al. 2012; Pebrel-Richard et al. 2012; Weisfeld-Adams et al. 2012). En nuestras colecciones de muestras de DI y de TEA, estas CNVs 22q11 menos usuales están presentes en un 0,35% y un 0,97% de los pacientes, respectivamente (**ARTÍCULOS I y VII**). Los pacientes ID_305 (varón de 10 años con DI leve y TDAH; [arr 4q28.1(126.286.442-126.508.782)x3 mat,22q11.21(20.728.956-21.465.659)x3 mat]) e ID_382 (varón de 13 años con DI, torpeza motora y facies triangular; [arr 22q11.21(20.728.956-21.465.659)x3]) presentaron una ganancia 22q11.21 idéntica de 736,7 kb (coincidente con el extremo distal del síndrome de la microdeleción/microduplicación 22q11; de herencia materna en el primer caso y desconocida en el segundo), que afecta a los genes *ZNF74*, *SCARF2*, *KLHL22*, *MED15*, *POM121L4P*, *TMEM191A*, *PI4KA*, *SERPIND1*, *SNAP29*, *CRKL*, *AIFM3*, *LZTR1*, *THAP7*, *FLJ39582*, *MGC16703*, *P2RX6*, *SLC7A4*, *P2RX6P* y *LOC400891* y de la que existen múltiples ejemplos en las bases de datos de pacientes ISCA y DECIPHER, sin un consenso en relación a su relevancia clínica. También se han publicado

descripciones clínicas de pacientes con CNVs equivalentes a la encontrada en nuestras muestras (García-Minaur et al. 2002; Rauch et al. 2005; Ou et al. 2008; Pebrel-Richard et al. 2012); en concreto, las duplicaciones se detectaron en un neonato con genitales ambiguos y en su padre, fenotípicamente normal (Ou et al. 2008) y en un niño de 3 años con retraso motor, trastorno del lenguaje y dismorfismo facial leve y en su madre con habla nasal y dislexia pero con desarrollo intelectual normal (Pebrel-Richard et al. 2012). Varios de los genes duplicados en estos pacientes y en nuestras dos muestras han sido propuestos como candidatos de algunos aspectos fenotípicos de los síndromes DGS/VCFS. Entre ellos, destacan *CRKL* como posible responsable de las anomalías cardíacas (García-Minaur et al. 2002) y *ZNF74*, *MED15*, *PI4KA* y *SNAP29* por conferir, potencialmente, susceptibilidad a trastornos psiquiátricos (Saito et al. 2001; Takase et al. 2001; Sandhu et al. 2004; Wonodi et al. 2005; Vorstman et al. 2009; Luo et al. 2014; Butler et al. 2016). El gen *SNAP29* (*synaptosomal-associated protein, 29-KD*; OMIM 604202) es, además, un gen implicado en formas recesivas de DI (McDonald-McGinn et al. 2013; Pinto et al. 2014). Se necesitan más estudios para determinar si el incremento de dosis de estos u otros genes de la CNV podrían o no tener efectos sobre el fenotipo de los pacientes, una tarea todavía más complicada en el caso de nuestro paciente ID_305 [arr[hg19] 4q28.1(126,286,442-126,508,782)x3 mat, 22q11.21(20,728,956-21,465,659)x3 mat] debido la presencia de una ganancia 4q28.1 de patogenicidad incierta adicional en su genoma (**ARTÍCULO I**). Las CNVs 22q11 atípicas identificadas en la cohorte de TEA consistieron en 3 ganancias 22q11.22q11.23 de 654,48 kb (ASD_139 [arr 22q11.22q11.23(22.997.928-23.652.512)x3 mat]; varón de 9 años con TEA y DI de grado moderado), de 2,1 Mb (ASD_250 [arr 15q11.2(22.770.421-23.291.159)x3,22q11.22q11.23(22.998.336-25.059.631)x3]); varón de 10 años con TEA, DI y conductas agresivas, quien también presentó una ganancia 15q11.2 considerada patogénica) y de 355,37 kb (ASD_289 [arr 22q11.22q11.23(23.187.341-23.542.711)x3 mat], varón de 3 años con TEA), ninguna solapante con las de los pacientes de DI anteriormente discutidas. La región mínima común de estas alteraciones (equivalente a la ganancia de la muestra ASD_289), coincide con el extremo distal del síndrome de la delección 22q11.2 distal (OMIM 611867) (entre las LCR22s E y F), incluye los genes *IGLL5*, *RTDR1*, *GNAZ*, *RAB36* y *BCR* y se consideró posiblemente patogénica en base a la existencia de múltiples ejemplos en ISCA y DECIPHER de pacientes con CNVs equivalentes consideradas, principalmente, posiblemente patogénicas o inciertas. Por su parte, la ganancia de 2,1 Mb identificada en la muestra ASD_250 se extiende entre las LCR22s E - H y abarca los genes *MIR650*, *IGLL5*, *RTDR1*, *GNAZ*, *RAB36*, *BCR*, *FBXW4P1*, *ZDHHC8P1*, *IGLL1*, *C22orf43*, *LOC91316*, *RGL4*, *ZNF70*, *VPREB3*, *C22orf15*, *CHCHD10*, *MMP11*, *SMARCB1*, *DERL3*, *SLC2A11*, *MIF*, *GSTT2B*, *GSTT2*, *DDTL*, *DDT*, *GSTTP1*, *LOC391322*, *GSTT1*, *GSTTP2*, *CABIN1*, *SUSD2*, *GGT5*, *POM121L9P*, *SPECC1L*, *ADORA2A*, *C22orf45*, *UPB1*, *C22orf13*, *SNRPD3*, *GGT1*, *C22orf36*, *LOC644165* y *POM121L10P*. Esta alteración es equivalente a las presentes en múltiples pacientes con trastornos del neurodesarrollo, tanto heredadas como *de novo*, registrados en las bases de datos y/o descritos en la literatura científica (Descartes et al. 2008; Coppinger et al. 2009; Shimojima et al. 2010; Tan et al. 2011). Estas descripciones consistieron en: (1) varios miembros de una familia con un fenotipo variable pero principalmente caracterizado por problemas de aprendizaje, DI y rasgos dismórficos (Descartes et al. 2008); (2) un varón con problemas del habla y motores, hipotonía profunda, convulsiones, microcefalia y dismorfismo facial, una mujer recién nacida con rasgos dismórficos y anomalías congénitas y un varón con ligero retraso del desarrollo, TDAH, macrocefalia y dismorfismo facial (Coppinger et al. 2009); (3) un niño con retraso del desarrollo, hiperactividad, epilepsia y rasgos faciales dismórficos (Shimojima et al. 2010) y

(4) un varón con retraso global del desarrollo profundo y convulsiones (Tan et al. 2011). Otras descripciones de pacientes con ganancias entre las LCR22s F - H, contenidas en la identificada en nuestra muestra ASD_250 y en las publicaciones anteriormente citadas, incluyeron: (1) un varón con retraso del desarrollo profundo, microcefalia, rasgos dismórficos, hipotonía profunda y anomalías genitales, un varón con apraxia y disartria, dismorfismo facial, hipotonía leve y testículos no descendidos y un tercer niño con retrasos en el lenguaje expresivo, apraxia, macrocefalia y bajo tono muscular (Coppinger et al. 2009); (2) un niño con retraso del desarrollo, rasgos faciales dismórficos y anomalías oftalmológicas y esqueléticas (Molck et al. 2015) y una mujer con retraso del desarrollo, DI, apraxia, dismorfismo facial, microcefalia, hipotonía profunda y convulsiones (Chang et al. 2015). Resulta evidente la extrema heterogeneidad fenotípica, incluso entre miembros de una misma familia, ligada a estas ganancias 22q11 atípicas; un hecho que podría explicarse por la combinación con CNVs adicionales, como es el caso de algunos pacientes de la literatura (Tan et al. 2011; Molck et al. 2015) y de nuestra muestra ASD_250, quien también presentó con una ganancia 15q11.2. Entre los genes duplicados en la región 22q11.22q11.23 destaca *SMARCB1* (*SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1*; OMIM 601607), conocido por su implicación en DI autosómica dominante (OMIM 614608) y encontrado también entre los 15 genes duplicados en la paciente 14242_3660 con TEA del AGP (Pinto et al. 2014). Genes candidato adicionales incluyen *ZNF70*, *MMP11*, *MIF*, *CABIN1*, *SPECC1L*, *ADORA2A* y *SNRPD3* [ver (Molck et al. 2015)] (**ARTÍCULO VII**).

Por último, los pacientes ASD_109 [[arr Xp22.31(6.446.579-8.135.644)x2 mat,6q14.1q15(83.648.997-88.613.065)x1 no mat]; varón de 8 años descrito en detalle en el **ARTÍCULO IX** (Quintela et al. 2015f)] y ASD_230 [[arr Xp22.31(6.630.120-8.135.644)x2,7p22.3(1.201.674-1.817.997)x3]; varón de 13 años con TEA) presentaron ganancias equivalentes -de herencia materna y desconocida, respectivamente- en la región subtelomérica Xp22.31 (**ARTÍCULO VII**) que incluyen al gen *STS* (*steroid sulfatase*; OMIM 300747), implicado en ictiosis ligada al X cuando está mutado o delecionado (OMIM 308100). Existe controversia en relación con la patogenicidad de esta alteración (Shaw-Smith et al. 2004; Shaffer et al. 2006; Shaffer et al. 2007; Baldwin et al. 2008; Mencarelli et al. 2008; Li et al. 2010; Furrow et al. 2011; Liu et al. 2011; Faletra et al. 2012; Esplin et al. 2014), habiéndose descrito, tanto *de novo* como heredada de progenitores no afectados, en múltiples pacientes de la literatura con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo RGD/DI y TEA, dismorfismo facial y anomalías congénitas. Entre las posibles causas de esta heterogeneidad fenotípica [**ARTÍCULO IX**; (Quintela et al. 2015f)], se ha sugerido que estas ganancias Xp22.31 actuarían como factores de riesgo desencadenantes del fenotipo sólo en presencia de factores adicionales (Liu et al. 2011). La interpretación clínica de este tipo de hallazgos genéticos es, por tanto, difícil y se complica, todavía más, si el paciente presenta alteraciones genéticas adicionales que, por sí mismas, son causales y generan fenotipos solapantes con los descritos para la ganancia Xp22.31. Este es el caso de la muestra ASD_109, también con una deleción 6q14.1-q15 de 4,96 Mb considerada patogénica [**ARTÍCULO IX**; (Quintela et al. 2015f)] y podría darse también en la muestra ASD_230, quien presentó una ganancia 7p22.3 adicional de 616 kb aunque, por el momento, desconocemos su significación clínica. Se trata de una alteración que afecta a los genes *UNCX*, *MICALL2*, *INTS1*, *MAFK*, *TMEM184A*, *PSMG3*, *KIAA1908*, *TFAMP1* y *ELFNI* (**ARTÍCULO VII**), de la que existe escasa información en la literatura y en las bases de datos que nos permita correlacionarla con el fenotipo; no obstante, conviene destacar el papel del

gen *Elfn1* (*extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 1*) en diversas funciones sinápticas en ratones (Sylwestrak y Ghosh 2012; Tomioka et al. 2014) y su potencial implicación en hiperactividad/TDAH, convulsiones y epilepsia (Dolan y Mitchell 2013; Tomioka et al. 2014). De acuerdo con estas publicaciones, la paciente DECIPHER 284772 presentó una ganancia de herencia desconocida de 311,4 kb (contenida en la de nuestro paciente e incluyendo al gen *ELFNI*), considerada probablemente causal de DI moderada y convulsiones. Aunque se necesitan más estudios para poder implicar a la ganancia 7p22.3 en el TEA de nuestro paciente ASD_230, la revisión de la literatura y nuestros propios hallazgos sugieren que la búsqueda de segundos impactos, tanto genéticos (en forma de CNV o SNV) o epigenéticos como ambientales, estaría justificada en los pacientes con ganancias subteloméricas Xp22.31.

CNVs benignas. En esta última categoría de CNVs, que suponen un 14,0% y un 11,8% del total de las CNVs exónicas raras detectadas en nuestras cohortes de DI y de TEA, respectivamente, se incluyeron aquellas variantes que afectaban a ARNs no codificantes o que eran pobres en genes, sin evidencias de asociación con el fenotipo para ninguno de los genes incluidos en la alteración, así como CNVs catalogadas como benignas en las bases de datos y/o en la literatura (ver apartados "Material y Métodos" de los **ARTÍCULOS I** y **VII**). En este punto, es importante destacar la identificación de dos pacientes en nuestra cohorte de DI con deleciones heterocigotas en genes de DI/RGD/TEA autosómicos recesivos: (1) La paciente ID_130 [arr 7q22.1(103.295.580-103.397.082)x1] es una niña de 1 año con RGD e hipotonía y una deleción heterocigota de 101,5 kb localizada en el cromosoma 7q22.1 y que afecta a 8 de los 66 exones de *RELN* (*reelin*; OMIM 600514). Este gen que codifica la relina, una glicoproteína con importantes funciones en la migración y el posicionamiento neuronal en el cerebro en desarrollo. Mutaciones homocigotas en *RELN* son causa de lisencefalia-2 (tipo Norman-Roberts), acompañada de RGD y epilepsia (OMIM 257320). Aunque con resultados inconsistentes, *RELN* ha sido frecuentemente analizado mediante estudios de asociación de SNPs en diversos trastornos, principalmente TEA y esquizofrenia (revisado por (Folsom y Fatemi 2013; Lammert y Howell 2016) y estudios recientes de secuenciación de exomas/genomas han detectado mutaciones *de novo* en este gen en pacientes con TEA (Neale et al. 2012; De Rubeis et al. 2014; Iossifov et al. 2014; Yuen et al. 2015). (2) El paciente ID_599 [arr 8p22(15.545.640-15.893.002)x1 mat], un varón de 2 años con RGD síndromico, porta una deleción heterocigota en el cromosoma 8p22 que afecta a 5 de los 11 exones de *TUSC3* (*tumor suppressor candidate 3*; OMIM 601385) y su región intergénica adyacente. Esta alteración de 347,4 kb se detectó también en su hermano gemelo (con RGD) y en su madre, no afectada. Mutaciones homocigotas en el gen *TUSC3* son causa de DI no síndromica autosómica recesiva (MRT7; OMIM 611093). Hasta la fecha, la mayoría de pacientes con DI con defectos genéticos homocigotos en *TUSC3*, bien SNVs o CNVs (deleciones y duplicaciones), han sido identificados en familias consanguíneas, algunas con varios familiares afectados (Garshasbi et al. 2008; Molinari et al. 2008; Garshasbi et al. 2011; Khan et al. 2011; Loddo et al. 2013; El Chehadeh et al. 2015; Al-Amri et al. 2016). La deleción heterocigota encontrada en nuestra familia no explicaría las manifestaciones clínicas de los dos hermanos gemelos, siendo necesario el análisis de la secuencia del alelo no delecionado en búsqueda de una segunda variante (en forma de SNV o *indel*) y que, conjuntamente, inactiven completamente la función del gen. Aunque se ha secuenciado la región codificante de este gen en este paciente y no se ha encontrado ninguna otra variante (datos no mostrados), no podemos descartar la existencia de mutaciones en regiones reguladoras no codificantes.

La clasificación de las CNVs aquí presentada no debe considerarse como única ni definitiva; al contrario, podrá verse modificada, por ejemplo, con la publicación de nuevos trabajos que aporten evidencias de asociaciones genéticas con fenotipos del neurodesarrollo hasta la fecha desconocidas o no concluyentes y/o con la actualización de las bases de datos de variantes genéticas (Kearney et al. 2011). En este sentido, Palmer y col. (2013) demostraron que la interpretación y clasificación de los datos generados a partir de los paneles cromosómicos pueden variar si estos se reevalúan pasado un tiempo. Las razones que explican las diferencias en la interpretación de los datos incluyen: (i) nuevas evidencias en la literatura acerca del impacto fenotípico de las CNVs (como descubrimiento de genes clave o regiones mínimas de solapamiento en síndromes de microdelección/microduplicación), (ii) nuevas evidencias funcionales en relación a la patogenicidad de algunas CNVs, (iii) descubrimiento de nuevos genes candidatos o causales de trastornos del neurodesarrollo, (iv) remapeo del genoma con las nuevas secuencias de referencia y (v) refinamiento del contenido de las bases de datos de población control y de pacientes (Palmer et al. 2013).

La capacidad diagnóstica de los paneles de CGH y de SNPs en fenotipos del neurodesarrollo se sitúa, aproximadamente, en un 15-20%, incluyendo las anomalías cromosómicas microscópicas con excepción de la trisomía 21 (Zahir y Friedman 2007; Hochstenbach et al. 2009; Sagoo et al. 2009; Miller et al. 2010; Cooper et al. 2011; Hochstenbach et al. 2011). No obstante, este valor depende de diversos factores, entre los que se incluyen la plataforma y el *array* de genotipado (la densidad y distribución de las sondas y, en consecuencia, su cobertura del genoma), el espectro fenotípico de los pacientes (a mayor gravedad del fenotipo, mayor campo diagnóstico sobre todo si se asocia a dismorfología, anomalías congénitas, DI y epilepsia) (Schaaf et al. 2011; Beaudet 2013), los criterios de selección de las muestras (por ejemplo, si se han realizado o no análisis genéticos previos a los individuos evaluados), tamaño de la cohorte, el algoritmo de detección y los parámetros de calidad exigidos para la definición de las CNVs y/o los criterios establecidos para la clasificación de las CNVs (Hehir-Kwa et al. 2007; Koolen et al. 2009; Hehir-Kwa et al. 2010; Miller et al. 2010; Hochstenbach et al. 2011; Hehir-Kwa et al. 2013; Rodriguez-Revenga et al. 2013; Vulto-van Silfhout et al. 2013).

El campo diagnóstico de la estrategia de genotipado y los criterios de calidad y clasificación de las CNVs en nuestra cohorte de DI fue de un 11,2%, un valor en consonancia con el 10-20% estimado para este tipo de análisis en grandes series de pacientes con DI/retraso del desarrollo (Buysse et al. 2009; Hochstenbach et al. 2009; Koolen et al. 2009; Sagoo et al. 2009; Miller et al. 2010; Xiang et al. 2010; Cooper et al. 2011; Hochstenbach et al. 2011; Kaminsky et al. 2011) y en cohortes de DI de tamaños similares a la nuestra (Wincent et al. 2011; Bartnik et al. 2013; Rodriguez-Revenga et al. 2013; Shoukier et al. 2013; Bartnik et al. 2014; Kashevarova et al. 2014; Roberts et al. 2014; Choucair et al. 2015). Tal y como se indica en el **ARTÍCULO I**, la utilidad diagnóstica en nuestra muestra de DI se situó en un 6,3% para los pacientes evaluados con el panel Cytogenetics 2.7M y en un 12,5% para los individuos genotipados con el *microarray* CytoScan HD, a pesar de que ambos paneles tienen un diseño de alta resolución con cobertura del genoma completo. Resulta por tanto evidente, que la plataforma y el *array* de genotipado son factores a tener en cuenta a la hora de cuantificar la utilidad diagnóstica de los análisis de CNVs, tal y como se indicó en el párrafo anterior y se evidenció en publicaciones previas (Rodriguez-Revenga et al. 2013).

La utilidad de la aplicación de los *microarrays* cromosómicos ha sido también evaluada en series de pacientes con TEA, encontrándose variaciones entre las publicaciones (Bremer et al. 2011; Battaglia et al. 2013; Wisniewiecka-Kowalnik et al. 2013; Gazzellone et al. 2014;

Nava et al. 2014; Carreira et al. 2015; Oikonomakis et al. 2016). En nuestra cohorte de TEA, la aplicación del panel CytoScan HD y de los criterios de calidad y clasificación de las CNVs detallados en el **ARTÍCULO VII**, permitió proporcionar un diagnóstico genético definitivo al 5,8% de la muestra, un valor inferior al de nuestra serie de DI, pero similar al obtenido en pacientes con TEA de la literatura (Roberts et al. 2014). Parece, por tanto, que el fenotipo y/o los criterios de selección de los pacientes son también factores determinantes de la capacidad diagnóstica de este tipo de análisis.

Como se indicó anteriormente, otros factores que influyen en el rendimiento diagnóstico de los análisis de *microarrays* cromosómicos son los parámetros de calidad del genotipado y los criterios de inclusión y clasificación de las CNVs. En nuestros dos estudios hemos aplicado parámetros de calidad del genotipado conservativos (**ARTÍCULOS I y VII**), lo cual podría ocasionar la pérdida de CNVs clínicamente relevantes detectadas con un menor número y/o una menor densidad de marcadores. Además, dado que nuestro objetivo principal es el diagnóstico y que el conocimiento actual de los efectos de una CNV en regiones no codificantes es más limitado, únicamente hemos considerado las variantes exónicas en nuestros análisis (**ARTÍCULOS I y VII**). No obstante, la alteración de elementos reguladores localizados en secuencias intrónicas y/o intergénicas puede, también, relacionarse con fenotipos del neurodesarrollo (Spielmann y Klopocki 2013; Turner et al. 2016) por lo que, al menos potencialmente, también podríamos estar perdiendo variantes en regiones no codificantes con impacto clínico en nuestros pacientes. Por ello, sería recomendable reevaluar los datos pasado un tiempo, a medida que esta información esté disponible y validada para ser aplicada en un contexto diagnóstico. Finalmente, las variantes de significado clínico incierto representaron la mayor proporción de CNVs en ambas cohortes (50% y 64,7% de los eventos detectados en las colecciones de DI y TEA, respectivamente). Al menos potencialmente, esta categoría diagnóstica es también susceptible de sufrir modificaciones; en concreto, si se confirma el impacto clínico de las variantes posiblemente patogénicas (8,1% de las CNVs de los pacientes con DI y 9,4% de las CNVs de los pacientes con TEA), la capacidad diagnóstica en nuestras colecciones de DI y TEA se vería incrementada hasta un 13,6% y un 7,7%, respectivamente (**ARTÍCULOS I y VII**).

En resumen, la utilización de los paneles de SNPs de alta densidad del genoma completo en el diagnóstico genético de nuestros pacientes con trastornos del neurodesarrollo nos ha permitido obtener los siguientes resultados: (1) En nuestra cohorte de DI identificamos 186 CNVs exónicas raras -clasificadas como clínicamente relevantes (36%), de significado clínico incierto (50%) y benignas (14%)- en un 27,7% de los 573 pacientes estudiados. (2) En nuestra cohorte de TEA identificamos 85 CNVs exónicas raras -clasificadas como clínicamente relevantes (23,5%), de significado clínico incierto (64,7%) y benignas (11,8%)- en un 22,9% de los 310 pacientes estudiados. (3) La capacidad diagnóstica de nuestra estrategia de genotipado y clasificación de las CNVs se situó entre el 11,2%-13,6% de las muestras de DI y entre el 5,8%-7,7% de las muestras de TEA. (4) Los dos paneles de SNPs empleados en el estudio de DI difieren en su capacidad diagnóstica. (5) La capacidad diagnóstica del análisis de CNVs es dependiente de factores como el fenotipo en estudio y los criterios de selección/exclusión de las muestras. (6) Los trastornos del neurodesarrollo aquí evaluados son condiciones médicas clínica y genéticamente heterogéneas. (7) Las CNVs asociadas a los trastornos del neurodesarrollo se caracterizan, frecuentemente, por presentar expresividad variable y penetrancia incompleta, factores que dificultan el asesoramiento genético familiar. (8) Múltiples CNVs pueden concurrir en un mismo paciente y participar en sus manifestaciones fenotípicas.

Además, en este trabajo se han discutido los criterios para el análisis y la clasificación de las CNVs y se han proporcionado descripciones clínicas detalladas de algunos de los pacientes con CNVs exónicas raras consideradas patogénicas o potencialmente patogénicas. Esto nos ha permitido elaborar una base de datos genéticos y fenotípicos de pacientes con trastornos del neurodesarrollo, resultando en una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico genético.







CONCLUSIONES



5 CONCLUSIONES

1. La aplicación de los paneles de SNPs de alta densidad del genoma completo Cytogenomics 2.7M y CytoScan HD en nuestra cohorte de DI ha permitido la identificación de 186 CNVs exónicas raras -clasificadas como clínicamente relevantes (36%), de significado clínico incierto (50%) y benignas (14%)- en un 27,7% de los 573 pacientes estudiados.

2. La tasa de detección de pacientes con CNVs clínicamente relevantes de los paneles Cytogenomics 2.7M y CytoScan HD en nuestra cohorte de DI fue del 6,3% y 12,5%, respectivamente, resultando en una capacidad diagnóstica global del 11,2%.

3. Los análisis moleculares y las descripciones clínicas detalladas de los pacientes con CNVs clínicamente relevantes de nuestra cohorte de DI han permitido confirmar hallazgos previos de la literatura y aportar nuevo conocimiento al esclarecimiento de la etiología y las manifestaciones fenotípicas de diversos síndromes y trastornos genéticos asociados a la DI:

3. 1. Nuestra paciente con la microdelección 3q29 recurrente (ID_109) manifiesta déficit de atención, impulsividad y conductas ansiosas y obsesivas como rasgos distintivos. Nuestro paciente con la microduplicación 3q29 recíproca (ID_245) presenta un perfil conductual caracterizado por TDAH y trastorno negativista desafiante no descrito hasta la fecha en este proceso.

3. 2. La apariencia global de nuestro paciente con una microdelección 8q21.11q21.13 no materna (ID_474), especialmente su cara alargada más que redondeada, sus orejas (aunque de implantación baja) prominentes pero no rotadas posteriormente y la ausencia de puente nasal ancho y de pliegues epicánticos, le confieren un fenotipo facial similar sólo a un subgrupo de los pacientes con microdeleciones 8q21.11 descritos hasta la fecha.

3. 3. Aunque son necesarios estudios adicionales para poder determinar o descartar la contribución individual de cada uno de los genes incluidos en la microdelección 8q21.11q21.13 al fenotipo de nuestro paciente ID_474, *ZFHX4* destaca por su potencial contribución a ptosis aislada bilateral congénita, DI y anomalías congénitas.

3. 4. Las principales características fenotípicas y del comportamiento manifestadas por nuestro paciente ID_6 son compatibles con las identificadas en pacientes con deleciones del gen *SOX5*. Sin embargo, no podemos descartar que su fenotipo central (RGD, dificultades del lenguaje y del habla y problemas del comportamiento) resulte de la presencia concomitante de la ganancia 16p13.11p12.3 heredada de su madre y de la microdelección *SOX5 de novo*.

3. 5. Los hallazgos moleculares y clínicos de nuestros pacientes ID_191 e ID_533, con deleciones 4q13 parcialmente solapantes, han permitido la identificación de una región crítica mínima en la banda cromosómica 4q13.2, en la que destaca el gen *UBA6* como el principal candidato para explicar su fenotipo, específicamente DI leve y TDAH.

3. 6. La presencia de eventos de caída repentina inducidos por estímulos en algunos de los individuos con el síndrome de Coffin-Lowry, incluida nuestra paciente ID_166, con una deleción Xp22.12 no materna que afecta parcialmente a *RPS6KA3*, sugieren que este gen podría también desempeñar un papel importante en estos episodios.

3. 7. Los hallazgos de la literatura y la identificación de la deleción de dos exones del gen *CACNA1C* en nuestro paciente ID_45, con DI sindrómica leve, TDAH y problemas del comportamiento pero sin características de los síndromes de Brugada o de Timothy, apuntan hacia un papel relevante de este gen en el neurodesarrollo y en el comportamiento e indican que las CNVs y SNVs que afectan a un mismo gen pueden estar asociadas a fenotipos diferentes.

3. 8. La ganancia que afecta al gen *GRIA3* identificada en nuestro paciente ID_401 es la responsable de su fenotipo, principalmente caracterizado por DI, retraso del lenguaje y TDAH.

4. La aplicación del panel de SNPs de alta densidad del genoma completo CytoScan HD en nuestra cohorte de TEA ha permitido la identificación de 85 CNVs exónicas raras - clasificadas como clínicamente relevantes (23,5%), de significado clínico incierto (64,7%) y benignas (11,8%)- en un 22,9% de los 310 pacientes estudiados.

5. La capacidad diagnóstica de la estrategia de genotipado y los criterios de clasificación de las CNVs en nuestra cohorte de TEA fue del 5,8%.

6. Los análisis moleculares y las descripciones clínicas detalladas de los pacientes con CNVs clínicamente relevantes de nuestra cohorte de TEA han permitido confirmar hallazgos previos de la literatura y aportar nuevo conocimiento al esclarecimiento de la etiología y las manifestaciones fenotípicas de diversos síndromes y trastornos genéticos asociados al TEA:

6. 1. Algunos rasgos adicionales de la microdeleción 3q13.2q13.31 recurrente, presentes en nuestra paciente ASD_53, incluyen trastorno de ansiedad, comportamientos disruptivos y de ingesta compulsiva y alteraciones del sueño.

6. 2. Los genes *DRD3* y *ZBTB20* se presentan como potenciales candidatos para explicar los rasgos fenotípicos centrales de los pacientes con la microdeleción 3q13.2q13.31 recurrente.

6. 3. Nuestro paciente ASD_109, un varón con TEA, ausencia de lenguaje oral y rasgos faciales dismórficos y una microdeleción 6q14.1q15 patogénica no materna y una ganancia Xp22.31 de significado clínico incierto y herencia materna, ilustra la dificultad de la interpretación de este tipo de resultados genéticos.

6. 4. Entre los genes incluidos en la microdelección 6q14.1q15 de nuestro paciente destacan *PGM3*, *PRSS35*, *SNAP91*, *RIPPLY2*, *MRAP2*, *SYNCRIP*, *SNX14* y *HTR1E* como potenciales candidatos para explicar su fenotipo.

6. 5. Las manifestaciones clínicas y la gravedad del síndrome AUTS2 dependen de la localización de la variante, con un mayor grado de afectación cuando se altera el extremo 3' del gen.

6. 6. La revisión de la literatura y los hallazgos genéticos de nuestros pacientes ASD_229 y ASD_221, ambos con deleciones exónicas raras en *NRXNI*, apoyan el papel de este gen en el TEA, destacan el hecho de que múltiples CNVs pueden concurrir en un mismo paciente y participar en sus manifestaciones fenotípicas y apoyan la hipótesis de la relevancia de los exones 5' de este gen y del ARNm no codificante *AK127244* en el neurodesarrollo.

7. Las CNVs de significación incierta fueron la clase predominante en nuestras cohortes de DI y TEA, hecho que refleja la dificultad de la interpretación de los resultados derivados de este tipo de análisis y evidencia la necesidad de disponer de bases de datos genéticos y fenotípicos actualizadas de pacientes y controles.

8. La capacidad diagnóstica de nuestra estrategia de genotipado y clasificación de las CNVs podría alcanzar el 13,6% y el 7,7% de nuestras muestras de DI y TEA, respectivamente si estudios posteriores demuestran la significación clínica de las variantes con patogenicidad potencial.

9. Los criterios de selección de las CNVs y su posterior clasificación no deben, por tanto, considerarse definitivos; requiriéndose su revisión a medida que se avance en el conocimiento del genoma humano, surjan nuevas evidencias de asociaciones genéticas con fenotipos del neurodesarrollo y/o se actualicen las bases de datos.





BIBLIOGRAFÍA



6 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmoity AT, Hall JJ, Bittel DC, Yu S. 2011. 1.39 Mb inherited interstitial deletion in 12p13.33 associated with developmental delay. *Eur J Med Genet* **54**(2): 198-203.
- Agha Z, Iqbal Z, Azam M, Ayub H, Vissers LE, Gilissen C, Ali SH, Riaz M, Veltman JA, Pfundt R et al. 2014. Exome sequencing identifies three novel candidate genes implicated in intellectual disability. *PLoS One* **9**(11): e112687.
- Agha Z, Iqbal Z, Kleefstra T, Zweier C, Pfundt R, Qamar R, H VANB, Willemsen MH. 2015. A de novo microdeletion in NRXN1 in a Dutch patient with mild intellectual disability, microcephaly and gonadal dysgenesis. *Genetics research* **97**: e19.
- Al-Amri A, Saegh AA, Al-Mamari W, El-Asrag ME, Ivorra JL, Cardno AG, Inglehearn CF, Clapcote SJ, Ali M. 2016. Homozygous single base deletion in TUSC3 causes intellectual disability with developmental delay in an Omani family. *Am J Med Genet A*.
- Al Ageeli E, Drunat S, Delanoe C, Perrin L, Baumann C, Capri Y, Fabre-Teste J, Aboura A, Dupont C, Auvin S et al. 2014. Duplication of the 15q11-q13 region: clinical and genetic study of 30 new cases. *Eur J Med Genet* **57**(1): 5-14.
- Alkan C, Coe BP, Eichler EE. 2011. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat Rev Genet* **12**(5): 363-376.
- Almal SH, Padh H. 2012. Implications of gene copy-number variation in health and diseases. *J Hum Genet* **57**(1): 6-13.
- Allen-Brady K, Miller J, Matsunami N, Stevens J, Block H, Farley M, Krasny L, Pingree C, Lainhart J, Leppert M et al. 2009. A high-density SNP genome-wide linkage scan in a large autism extended pedigree. *Mol Psychiatry* **14**(6): 590-600.
- Allen NM, Conroy J, Shahwan A, Lynch B, Correa RG, Pena SD, McCreary D, Magalhaes TR, Ennis S, Lynch SA et al. 2016. Unexplained early onset epileptic encephalopathy: Exome screening and phenotype expansion. *Epilepsia* **57**(1): e12-17.
- Amarillo IE, Li WL, Li X, Vilain E, Kantarci S. 2014. De novo single exon deletion of AUTS2 in a patient with speech and language disorder: a review of disrupted AUTS2 and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am J Med Genet A* **164A**(4): 958-965.
- Amin N, Aulchenko YS, Dekker MC, Ferdinand RF, van Sprecken A, Temmink AH, Verhulst FC, Oostra BA, van Duijn CM. 2009. Suggestive linkage of ADHD to chromosome 18q22 in a young genetically isolated Dutch population. *Eur J Hum Genet* **17**(7): 958-966.
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. 1999. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* **23**(2): 185-188.
- Anney R, Klei L, Pinto D, Almeida J, Bacchelli E, Baird G, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T et al. 2012. Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet* **21**(21): 4781-4792.

- Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT et al. 2010. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet* **19**(20): 4072-4082.
- APA. 2000. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition, text revision*. American Psychiatric Association, Washington DC.
- . 2013. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed*. American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- Asai M, Ramachandrapa S, Joachim M, Shen Y, Zhang R, Nuthalapati N, Ramanathan V, Strohlic DE, Ferket P, Linhart K et al. 2013. Loss of function of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 is associated with mammalian obesity. *Science* **341**(6143): 275-278.
- Assawamakin A, Wattanasirichaigoon D, Tocharoentanaphol C, Waeteekul S, Tansatit M, Thongnoppakhun W, Limwongse C. 2012. A novel maternally-derived insertional translocation resulting in partial trisomy 4q13.2-q22.1 with complex translocation t(8;20) in a family with intellectual disability. *Am J Med Genet A* **158A**(4): 901-908.
- Athanasakis E, Licastro D, Faletra F, Fabretto A, Dipresa S, Vozzi D, Morgan A, d'Adamo AP, Pecile V, Biarnes X et al. 2014. Next generation sequencing in nonsyndromic intellectual disability: From a negative molecular karyotype to a possible causative mutation detection. *Am J Med Genet A* **164**(1): 170-176.
- Awadalla P, Gauthier J, Myers RA, Casals F, Hamdan FF, Griffing AR, Cote M, Henrion E, Spiegelman D, Tarabeux J et al. 2010. Direct measure of the de novo mutation rate in autism and schizophrenia cohorts. *Am J Hum Genet* **87**(3): 316-324.
- Aza-Carmona M, Shears DJ, Yuste-Checa P, Barca-Tierno V, Hisado-Oliva A, Belinchon A, Benito-Sanz S, Rodriguez JI, Argente J, Campos-Barros A et al. 2011. SHOX interacts with the chondrogenic transcription factors SOX5 and SOX6 to activate the aggrecan enhancer. *Hum Mol Genet* **20**(8): 1547-1559.
- Baca-Garcia E, Vaquero-Lorenzo C, Perez-Rodriguez MM, Gratacos M, Bayes M, Santiago-Mozos R, Leiva-Murillo JM, de Prado-Cumplido M, Artes-Rodriguez A, Ceverino A et al. 2010. Nucleotide variation in central nervous system genes among male suicide attempters. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(1): 208-213.
- Bachmann-Gagescu R, Mefford HC, Cowan C, Glew GM, Hing AV, Wallace S, Bader PI, Hamati A, Reitnauer PJ, Smith R et al. 2010. Recurrent 200-kb deletions of 16p11.2 that include the SH2B1 gene are associated with developmental delay and obesity. *Genet Med* **12**(10): 641-647.
- Baker P, Piven J, Schwartz S, Patil S. 1994. Brief report: duplication of chromosome 15q11-13 in two individuals with autistic disorder. *J Autism Dev Disord* **24**(4): 529-535.
- Bakkaloglu B, O'Roak BJ, Louvi A, Gupta AR, Abelson JF, Morgan TM, Chawarska K, Klin A, Ercan-Sencicek AG, Stillman AA et al. 2008. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **82**(1): 165-173.
- Balasubramanian M, Smith K, Mordekar SR, Parker MJ. 2011. Clinical report: AN INTERSTITIAL deletion of 16p13.11 detected by array CGH in a patient with infantile spasms. *Eur J Med Genet* **54**(3): 314-318.
- Baldwin EL, Lee JY, Blake DM, Bunke BP, Alexander CR, Kogan AL, Ledbetter DH, Martin CL. 2008. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med* **10**(6): 415-429.

- Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, Madan-Khetarpal S, Surti U, Jackson KE, Asamoah A, Brock PL, Gowans GC, Conway RL et al. 2007. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Nat Genet* **39**(9): 1071-1073.
- Barber JC, Hall V, Maloney VK, Huang S, Roberts AM, Brady AF, Foulds N, Bewes B, Volleth M, Liehr T et al. 2012. 16p11.2-p12.2 duplication syndrome; a genomic condition differentiated from euchromatic variation of 16p11.2. *Eur J Hum Genet*.
- Barber JC, Joyce CA, Collinson MN, Nicholson JC, Willatt LR, Dyson HM, Bateman MS, Green AJ, Yates JR, Dennis NR. 1998. Duplication of 8p23.1: a cytogenetic anomaly with no established clinical significance. *J Med Genet* **35**(6): 491-496.
- Bartnik M, Nowakowska B, Derwinska K, Wisniowiecka-Kowalnik B, Kedzior M, Bernaciak J, Ziemkiewicz K, Gambin T, Sykulski M, Bezniakow N et al. 2013. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability. *J Appl Genet*.
- Bartnik M, Wisniowiecka-Kowalnik B, Nowakowska B, Smyk M, Kedzior M, Sobecka K, Kutkowska-Kazmierczak A, Klapecki J, Szczaluba K, Castaneda J et al. 2014. The usefulness of array comparative genomic hybridization in clinical diagnostics of intellectual disability in children. *Developmental period medicine* **18**(3): 307-317.
- Bashi J. 1977. Effects of inbreeding on cognitive performance. *Nature* **266**(5601): 440-442.
- Battaglia A, Doccini V, Bernardini L, Novelli A, Loddo S, Capalbo A, Filippi T, Carey JC. 2013. Confirmation of chromosomal microarray as a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental delay, intellectual disability, autism spectrum disorders and dysmorphic features. *Eur J Paediatr Neurol* **17**(6): 589-599.
- Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, Bahi-Buisson N, Romano C, Williams CA, Brailey LL et al. 2008. Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* **121**(2): 404-410.
- Battaglia A, Novelli A, Bernardini L, Igliozzi R, Parrini B. 2009. Further characterization of the new microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. *Am J Med Genet A* **149A**(6): 1200-1204.
- Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* **128**(2): 485-490.
- Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K et al. 2008. Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res* **18**(6): 847-858.
- Bauters M, Van Esch H, Marynen P, Froyen G. 2005. X chromosome array-CGH for the identification of novel X-linked mental retardation genes. *Eur J Med Genet* **48**(3): 263-275.
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. 2003. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* **73**(1): 131-151.
- Beaudet AL. 2013. The utility of chromosomal microarray analysis in developmental and behavioral pediatrics. *Child Dev* **84**(1): 121-132.
- Ben-David E, Granot-HersHKovitz E, Monderer-Rothkoff G, Lerer E, Levi S, Yaari M, Eibstein RP, Yirmiya N, Shifman S. 2011. Identification of a functional rare variant in autism using genome-wide screen for monoallelic expression. *Hum Mol Genet* **20**(18): 3632-3641.

- Ben-David E, Shifman S. 2012. Networks of neuronal genes affected by common and rare variants in autism spectrum disorders. *PLoS Genet* **8**(3): e1002556.
- Bena F, Bruno DL, Eriksson M, van Ravenswaaij-Arts C, Stark Z, Dijkhuizen T, Gerkes E, Gimelli S, Ganesamoorthy D, Thuresson AC et al. 2013. Molecular and clinical characterization of 25 individuals with exonic deletions of NRXN1 and comprehensive review of the literature. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **162B**(4): 388-403.
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **21**(2): 172-175.
- Betancur C. 2011. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* **1380**: 42-77.
- Beunders G, de Munnik SA, Van der Aa N, Ceulemans B, Voorhoeve E, Groffen AJ, Nillesen WM, Meijers-Heijboer EJ, Kooy RF, Yntema HG et al. 2014. Two male adults with pathogenic AUTS2 variants, including a two-base pair deletion, further delineate the AUTS2 syndrome. *Eur J Hum Genet*.
- Beunders G, Voorhoeve E, Golzio C, Pardo LM, Rosenfeld JA, Talkowski ME, Simonic I, Lionel AC, Vergult S, Pyatt RE et al. 2013. Exonic deletions in AUTS2 cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am J Hum Genet* **92**(2): 210-220.
- Bhalla K, Luo Y, Buchan T, Beachem MA, Guzauskas GF, Ladd S, Bratcher SJ, Schroer RJ, Balsamo J, DuPont BR et al. 2008. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in patients with mild to severe intellectual disability. *Am J Hum Genet* **83**(6): 703-713.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD. 2012. CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol* **99**(1): 1-14.
- Bi W, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T, Shinder V, Peiffer DA, Gunderson KL et al. 2009. Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat Genet* **41**(2): 168-177.
- Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid BM, Lundin J, Lapunzina P, Perez Jurado LA, Delle Chiaie B et al. 2009. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* **52**(2-3): 77-87.
- Biris KK, Dunty WC, Jr., Yamaguchi TP. 2007. Mouse Ripply2 is downstream of Wnt3a and is dynamically expressed during somitogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **236**(11): 3167-3172.
- Bissar-Tadmouri N, Donahue WL, Al-Gazali L, Nelson SF, Bayrak-Toydemir P, Kantarci S. 2014. X chromosome exome sequencing reveals a novel ALG13 mutation in a nonsyndromic intellectual disability family with multiple affected male siblings. *Am J Med Genet A* **164A**(1): 164-169.
- Blaker-Lee A, Gupta S, McCammon JM, De Rienzo G, Sive H. 2012. Zebrafish homologs of genes within 16p11.2, a genomic region associated with brain disorders, are active during brain development, and include two deletion dosage sensor genes. *Dis Model Mech* **5**(6): 834-851.
- Bly M. 2005. Mutation in the vesicular monoamine gene, SLC18A1, associated with schizophrenia. *Schizophr Res* **78**(2-3): 337-338.
- Bonnet C, Ali Khan A, Bresso E, Vigouroux C, Beri M, Lejczak S, Deemer B, Andrieux J, Philippe C, Moncla A et al. 2013. Extended spectrum of MBD5 mutations in neurodevelopmental disorders. *Eur J Hum Genet*.

- Bonnet C, Leheup B, Beri M, Philippe C, Gregoire MJ, Jonveaux P. 2009. Aberrant GRIA3 transcripts with multi-exon duplications in a family with X-linked mental retardation. *Am J Med Genet A* **149A**(6): 1280-1289.
- Bonnet C, Masurel-Paulet A, Khan AA, Beri-Dexheimer M, Callier P, Mugneret F, Philippe C, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Jonveaux P. 2012. Exploring the potential role of disease-causing mutation in a gene desert: duplication of noncoding elements 5' of GRIA3 is associated with GRIA3 silencing and X-linked intellectual disability. *Hum Mutat* **33**(2): 355-358.
- Boone PM, Campbell IM, Baggett BC, Soens ZT, Rao MM, Hixson PM, Patel A, Bi W, Cheung SW, Lalani SR et al. 2013. Deletions of recessive disease genes: CNV contribution to carrier states and disease-causing alleles. *Genome Res* **23**(9): 1383-1394.
- Bremer A, Giacobini M, Eriksson M, Gustavsson P, Nordin V, Fernell E, Gillberg C, Nordgren A, Uppstromer A, Anderlid BM et al. 2011. Copy number variation characteristics in subpopulations of patients with autism spectrum disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156**(2): 115-124.
- Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre AJ, Kim M, Protopopov A, Chin L. 2004. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res* **64**(14): 4744-4748.
- Bruno DL, Anderlid BM, Lindstrand A, van Ravenswaaij-Arts C, Ganesamoorthy D, Lundin J, Martin CL, Douglas J, Nowak C, Adam MP et al. 2010. Further molecular and clinical delineation of co-locating 17p13.3 microdeletions and microduplications that show distinctive phenotypes. *J Med Genet* **47**(5): 299-311.
- Bucan M, Abrahams BS, Wang K, Glessner JT, Herman EI, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Imielinski M, Hadley D, Bradfield JP et al. 2009. Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. *PLoS Genet* **5**(6): e1000536.
- Buiting K. 2010. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **154C**(3): 365-376.
- Burnside RD, Pasion R, Mikhail FM, Carroll AJ, Robin NH, Youngs EL, Gadi IK, Keitges E, Jaswaney VL, Papenhausen PR et al. 2011. Microdeletion/microduplication of proximal 15q11.2 between BP1 and BP2: a susceptibility region for neurological dysfunction including developmental and language delay. *Hum Genet* **130**(4): 517-528.
- Butler MG, McGuire AB, Masoud H, Manzardo AM. 2016. Currently recognized genes for schizophrenia: High-resolution chromosome ideogram representation. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **171**(2): 181-202.
- Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Lehner T, Roeder K, State MW, Autism Sequencing C. 2012. The autism sequencing consortium: large-scale, high-throughput sequencing in autism spectrum disorders. *Neuron* **76**(6): 1052-1056.
- Buyse K, Delle Chiaie B, Van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. 2009. Challenges for CNV interpretation in clinical molecular karyotyping: lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* **52**(6): 398-403.
- Caliskan M, Chong JX, Uricchio L, Anderson R, Chen P, Sougnez C, Garimella K, Gabriel SB, dePristo MA, Shakir K et al. 2011. Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13. *Hum Mol Genet* **20**(7): 1285-1289.

- Camarena V, Cao L, Abad C, Abrams A, Toledo Y, Araki K, Araki M, Walz K, Young JI. 2014. Disruption of Mbd5 in mice causes neuronal functional deficits and neurobehavioral abnormalities consistent with 2q23.1 microdeletion syndrome. *EMBO molecular medicine* **6**(8): 1003-1015.
- Campbell IM, Gambin T, Dittwald P, Beck CR, Shuvarikov A, Hixson P, Patel A, Gambin A, Shaw CA, Rosenfeld JA et al. 2014. Human endogenous retroviral elements promote genome instability via non-allelic homologous recombination. *BMC biology* **12**: 74.
- Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrao J, Jardim A, Mascarenhas A, Pinto M, Lavoura N, Pais C et al. 2015. Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* **8**: 103.
- Carter NP. 2007. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* **39**(7 Suppl): S16-21.
- Caruana G, Bernstein A. 2001. Craniofacial dysmorphogenesis including cleft palate in mice with an insertional mutation in the discs large gene. *Mol Cell Biol* **21**(5): 1475-1483.
- Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. 2004. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* **57**(6): 644-646.
- Carvill GL, Mefford HC. 2013. Microdeletion syndromes. *Curr Opin Genet Dev* **23**(3): 232-239.
- Castillo A, Kramer N, Schwartz CE, Miles JH, DuPont BR, Rosenfeld JA, Graham JM, Jr. 2014. 19q13.32 microdeletion syndrome: three new cases. *Eur J Med Genet* **57**(11-12): 654-658.
- Ceulemans S, van der Ven K, Del-Favero J. 2012. Targeted screening and validation of copy number variations. *Methods Mol Biol* **838**: 311-328.
- Classen CF, Riehrer V, Landwehr C, Kosfeld A, Heilmann S, Scholz C, Kabisch S, Engels H, Tierling S, Zivicnjak M et al. 2013. Dissecting the genotype in syndromic intellectual disability using whole exome sequencing in addition to genome-wide copy number analysis. *Hum Genet* **132**(7): 825-841.
- Coe BP, Witherspoon K, Rosenfeld JA, van Bon BW, Vulto-van Silfhout AT, Bosco P, Friend KL, Baker C, Buono S, Vissers LE et al. 2014. Refining analyses of copy number variation identifies specific genes associated with developmental delay. *Nat Genet* **46**(10): 1063-1071.
- Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, Deardorff MA, Krantz ID, Hakonarson H, Spinner NB. 2010. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet* **19**(7): 1263-1275.
- Constantino JN, Todorov A, Hilton C, Law P, Zhang Y, Molloy E, Fitzgerald R, Geschwind D. 2013. Autism recurrence in half siblings: strong support for genetic mechanisms of transmission in ASD. *Mol Psychiatry* **18**(2): 137-138.
- Cooper GM, Coe BP, Girirajan S, Rosenfeld JA, Vu TH, Baker C, Williams C, Stalker H, Hamid R, Hannig V et al. 2011. A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* **43**(9): 838-846.
- Copping J, McDonald-McGinn D, Zackai E, Shane K, Atkin JF, Asamoah A, Leland R, Weaver DD, Lansky-Shafer S, Schmidt K et al. 2009. Identification of familial and de novo microduplications of 22q11.21-q11.23 distal to the 22q11.21 microdeletion syndrome region. *Hum Mol Genet* **18**(8): 1377-1383.
- Corpas M, Bragin E, Clayton S, Bevan P, Firth HV. 2012. Interpretation of genomic copy number variants using DECIPHER. *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 8**: Unit 8 14.

- Costeff H, Cohen BE, Weller L. 1972. Parental consanguinity among Israeli mental retardates. *Acta paediatrica Scandinavica* **61**(4): 452-458.
- Cukier HN, Lee JM, Ma D, Young JI, Mayo V, Butler BL, Ramsook SS, Rantus JA, Abrams AJ, Whitehead PL et al. 2012. The Expanding Role of MBD Genes in Autism: Identification of a MECP2 Duplication and Novel Alterations in MBD5, MBD6, and SETDB1. *Autism Res*.
- Curran S, Ahn JW, Grayton H, Collier DA, Ogilvie CM. 2013. NRXN1 deletions identified by array comparative genome hybridisation in a clinical case series - further understanding of the relevance of NRXN1 to neurodevelopmental disorders. *Journal of molecular psychiatry* **1**(1): 4.
- Curran S, Bolton P, Rozsnyai K, Chiocchetti A, Klauck SM, Duketis E, Poustka F, Schlitt S, Freitag CM, Lee I et al. 2011. No association between a common single nucleotide polymorphism, rs4141463, in the MACROD2 gene and autism spectrum disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156B**(6): 633-639.
- Cusco I, Corominas R, Bayes M, Flores R, Rivera-Brugues N, Campuzano V, Perez-Jurado LA. 2008. Copy number variation at the 7q11.23 segmental duplications is a susceptibility factor for the Williams-Beuren syndrome deletion. *Genome Res* **18**(5): 683-694.
- Chahrour MH, Yu TW, Lim ET, Ataman B, Coulter ME, Hill RS, Stevens CR, Schubert CR, Collaboration AAS, Greenberg ME et al. 2012. Whole-exome sequencing and homozygosity analysis implicate depolarization-regulated neuronal genes in autism. *PLoS Genet* **8**(4): e1002635.
- Chan T, Kondow A, Hosoya A, Hitachi K, Yukita A, Okabayashi K, Nakamura H, Ozawa H, Kiyonari H, Michiue T et al. 2007. Ripply2 is essential for precise somite formation during mouse early development. *FEBS letters* **581**(14): 2691-2696.
- Chang J, Zhao L, Chen C, Peng Y, Xia Y, Tang G, Bai T, Zhang Y, Ma R, Guo R et al. 2015. Pachygyria, seizures, hypotonia, and growth retardation in a patient with an atypical 1.33Mb inherited microduplication at 22q11.23. *Gene* **569**(1): 46-50.
- Chen L, Zhou W, Zhang L, Zhang F. 2014. Genome architecture and its roles in human copy number variation. *Genomics & informatics* **12**(4): 136-144.
- Chen SF, Chen CH, Chen JY, Wang YC, Lai IC, Liou YJ, Liao DL. 2007. Support for association of the A277C single nucleotide polymorphism in human vesicular monoamine transporter 1 gene with schizophrenia. *Schizophr Res* **90**(1-3): 363-365.
- Chilian B, Abdollahpour H, Bierhals T, Haltrich I, Fekete G, Nagel I, Rosenberger G, Kutsche K. 2013. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clin Genet* **84**(6): 560-565.
- Chiyonobu T, Hayashi S, Kobayashi K, Morimoto M, Miyanomae Y, Nishimura A, Nishimoto A, Ito C, Imoto I, Sugimoto T et al. 2007. Partial tandem duplication of GRIA3 in a male with mental retardation. *Am J Med Genet A* **143A**(13): 1448-1455.
- Choucair N, Ghoch JA, Corbani S, Cacciagli P, Mignon-Ravix C, Salem N, Jalkh N, El Sabbagh S, Fawaz A, Ibrahim T et al. 2015. Contribution of copy number variants (CNVs) to congenital, unexplained intellectual and developmental disabilities in Lebanese patients. *Mol Cytogenet* **8**: 26.
- Christensen DL, Baio J, Braun KV, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M et al. 2016. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries* **65**(3): 1-23.

- Chung BH, Mullegama S, Marshall CR, Lionel AC, Weksberg R, Dupuis L, Brick L, Li C, Scherer SW, Aradhya S et al. 2012. Severe intellectual disability and autistic features associated with microduplication 2q23.1. *Eur J Hum Genet* **20**(4): 398-403.
- Chung BH, Stavropoulos J, Marshall CR, Weksberg R, Scherer SW, Yoon G. 2011. 2q23 de novo microdeletion involving the MBD5 gene in a patient with developmental delay, postnatal microcephaly and distinct facial features. *Am J Med Genet A* **155A**(2): 424-429.
- Chung YJ, Jonkers J, Kitson H, Fiegler H, Humphray S, Scott C, Hunt S, Yu Y, Nishijima I, Velds A et al. 2004. A whole-genome mouse BAC microarray with 1-Mb resolution for analysis of DNA copy number changes by array comparative genomic hybridization. *Genome Res* **14**(1): 188-196.
- D'Amours G, Langlois M, Mathonnet G, Fetni R, Nizard S, Srour M, Tihy F, Phillips MS, Michaud JL, Lemyre E. 2014. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. *BMC medical genomics* **7**: 70.
- Dabell MP, Rosenfeld JA, Bader P, Escobar LF, El-Khechen D, Vallee SE, Dinulos MB, Curry C, Fisher J, Tervo R et al. 2013. Investigation of NRXN1 deletions: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet A* **161A**(4): 717-731.
- Dang VT, Kassahn KS, Marcos AE, Ragan MA. 2008. Identification of human haploinsufficient genes and their genomic proximity to segmental duplications. *Eur J Hum Genet* **16**(11): 1350-1357.
- Dasouki MJ, Lushington GH, Hovanes K, Casey J, Gorre M. 2013. The 3q29 microdeletion syndrome: report of three new unrelated patients and in silico "RNA binding" analysis of the 3q29 region. *Am J Med Genet A* **155A**(7): 1654-1660.
- De Gregori M, Ciccone R, Magini P, Pramparo T, Gimelli S, Messa J, Novara F, Vetro A, Rossi E, Maraschio P et al. 2007. Cryptic deletions are a common finding in "balanced" reciprocal and complex chromosome rearrangements: a study of 59 patients. *J Med Genet* **44**(12): 750-762.
- de Kovel CG, Trucks H, Helbig I, Mefford HC, Baker C, Leu C, Kluck C, Muhle H, von Spiczak S, Ostertag P et al. 2010. Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies. *Brain* **133**(Pt 1): 23-32.
- de la Barra F, Skoknic V, Alliende A, Raimann E, Cortes F, Lacassie Y. 1986. [Twins with autism and mental retardation associated with balanced (7;20) chromosomal translocation]. *Revista chilena de pediatria* **57**(6): 549-554.
- de Leeuw N, Dijkhuizen T, Hehir-Kwa JY, Carter NP, Feuk L, Firth HV, Kuhn RM, Ledbetter DH, Martin CL, van Ravenswaaij-Arts CM et al. 2012. Diagnostic interpretation of array data using public databases and internet sources. *Hum Mutat*.
- de Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LE, de Leeuw N, Shaw C, Brunner HG, Lupski JR, Veltman JA, Hehir-Kwa JY. 2014. Platform comparison of detecting copy number variants with microarrays and whole-exome sequencing. *Genomics data* **2**: 144-146.
- de Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LE, Richmond T, Geoghegan J, O'Moore K, de Leeuw N, Shaw C, Brunner HG et al. 2013. Detection of clinically relevant copy number variants with whole-exome sequencing. *Hum Mutat* **34**(10): 1439-1448.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C et al. 2012. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med* **367**(20): 1921-1929.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S et al. 2014. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**(7526): 209-215.

- de Vries BB, Pfundt R, Leisink M, Koolen DA, Vissers LE, Janssen IM, Reijmersdal S, Nillesen WM, Huys EH, Leeuw N et al. 2005. Diagnostic genome profiling in mental retardation. *Am J Hum Genet* **77**(4): 606-616.
- De Wolf V, Brison N, Devriendt K, Peeters H. 2013. Genetic counseling for susceptibility loci and neurodevelopmental disorders: the del15q11.2 as an example. *Am J Med Genet A* **161A**(11): 2846-2854.
- Deciphering Developmental Disorders S. 2015. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* **519**(7542): 223-228.
- Dekaan S, Klein D. 1968. Familial mental retardation. *Acta Genet Stat Med* **18**(3): 206-228.
- Delaunoy J, Abidi F, Zeniou M, Jacquot S, Merienne K, Pannetier S, Schmitt M, Schwartz C, Hanauer A. 2001. Mutations in the X-linked RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome. *Hum Mutat* **17**(2): 103-116.
- Delaunoy JP, Dubos A, Marques Pereira P, Hanauer A. 2006. Identification of novel mutations in the RSK2 gene (RPS6KA3) in patients with Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet* **70**(2): 161-166.
- Demars J, Gicquel C. 2012. Epigenetic and genetic disturbance of the imprinted 11p15 region in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes. *Clin Genet* **81**(4): 350-361.
- Demyanenko GP, Halberstadt AI, Rao RS, Maness PF. 2009. CHL1 cooperates with PAK1-3 to regulate morphological differentiation of embryonic cortical neurons. *Neuroscience* **165**(1): 107-115.
- Depienne C, Moreno-De-Luca D, Heron D, Bouteiller D, Gennetier A, Delorme R, Chaste P, Siffroi JP, Chantot-Bastaraud S, Benyahia B et al. 2009. Screening for genomic rearrangements and methylation abnormalities of the 15q11-q13 region in autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry* **66**(4): 349-359.
- Descartes M, Franklin J, Diaz de Stahl T, Piotrowski A, Bruder CE, Dumanski JP, Carroll AJ, Mikhail FM. 2008. Distal 22q11.2 microduplication encompassing the BCR gene. *Am J Med Genet A* **146A**(23): 3075-3081.
- Devlin B, Scherer SW. 2012. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev* **22**(3): 229-237.
- Dhami P, Coffey AJ, Abbs S, Vermeesch JR, Dumanski JP, Woodward KJ, Andrews RM, Langford C, Vetrie D. 2005. Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am J Hum Genet* **76**(5): 750-762.
- Dimitratos SD, Woods DF, Stathakis DG, Bryant PJ. 1999. Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family. *Bioessays* **21**(11): 912-921.
- Dittwald P, Gambin T, Szafranski P, Li J, Amato S, Divon MY, Rodriguez Rojas LX, Elton LE, Scott DA, Schaaf CP et al. 2013. NAHR-mediated copy-number variants in a clinical population: mechanistic insights into both genomic disorders and Mendelizing traits. *Genome Res* **23**(9): 1395-1409.
- Doco-Fenzy M, Landais E, Andrieux J, Schneider A, Delemer B, Sulmont V, Melin JP, Ploton D, Thevenard J, Monboisse JC et al. 2008. Deletion 2q36.2q36.3 with multiple renal cysts and severe mental retardation. *Eur J Med Genet* **51**(6): 598-607.
- Dolan J, Mitchell KJ. 2013. Mutation of E1fn1 in mice causes seizures and hyperactivity. *PLoS One* **8**(11): e80491.

- Drews CD, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P, Murphy CC. 1995. Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. *American journal of public health* **85**(3): 329-334.
- Du X, An Y, Yu L, Liu R, Qin Y, Guo X, Sun D, Zhou S, Wu B, Jiang YH et al. 2014. A genomic copy number variant analysis implicates the MBD5 and HNRNPU genes in Chinese children with infantile spasms and expands the clinical spectrum of 2q23.1 deletion. *BMC Med Genet* **15**: 62.
- Du Y, Liu B, Guo F, Xu G, Ding Y, Liu Y, Sun X. 2012. The essential role of mbd5 in the regulation of somatic growth and glucose homeostasis in mice. *PLoS One* **7**(10): e47358.
- Duong LT, Hoeffding LK, Petersen KB, Knudsen CD, Thygesen JH, Klitten LL, Tommerup N, Ingason A, Werge T. 2015. Two rare deletions upstream of the NRXN1 gene (2p16.3) affecting the non-coding mRNA AK127244 segregate with diverse psychopathological phenotypes in a family. *Eur J Med Genet* **58**(12): 650-653.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H et al. 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* **39**(1): 25-27.
- Durkin M. 2002. The epidemiology of developmental disabilities in low-income countries. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **8**(3): 206-211.
- Durkin MS, Hasan ZM, Hasan KZ. 1998. Prevalence and correlates of mental retardation among children in Karachi, Pakistan. *American journal of epidemiology* **147**(3): 281-288.
- Durkin MS, Khan NZ, Davidson LL, Huq S, Munir S, Rasul E, Zaman SS. 2000. Prenatal and postnatal risk factors for mental retardation among children in Bangladesh. *American journal of epidemiology* **152**(11): 1024-1033.
- Ebert DH, Greenberg ME. 2013. Activity-dependent neuronal signalling and autism spectrum disorder. *Nature* **493**(7432): 327-337.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. 1999. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* **8**(7): 1157-1167.
- El Chehadeh S, Bonnet C, Callier P, Beri M, Dupre T, Payet M, Ragon C, Mosca-Boidron AL, Marle N, Mugneret F et al. 2015. Homozygous Truncating Intragenic Duplication in TUSC3 Responsible for Rare Autosomal Recessive Nonsyndromic Intellectual Disability with No Clinical or Biochemical Metabolic Markers. *JIMD reports* **20**: 45-55.
- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, Kim YS, Kauchali S, Marcin C, Montiel-Nava C, Patel V, Paula CS, Wang C et al. 2012. Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res* **5**(3): 160-179.
- Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG. 2013. Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med* **64**: 441-450.
- Emerson E. 2007. Poverty and people with intellectual disabilities. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **13**(2): 107-113.
- Engbers HM, Berger R, van Hasselt P, de Koning T, de Sain-van der Velden MG, Kroes HY, Visser G. 2008. Yield of additional metabolic studies in neurodevelopmental disorders. *Annals of neurology* **64**(2): 212-217.
- Ensenauer RE, Adeyinka A, Flynn HC, Michels VV, Lindor NM, Dawson DB, Thorland EC, Lorentz CP, Goldstein JL, McDonald MT et al. 2003. Microduplication 22q11.2, an emerging

- syndrome: clinical, cytogenetic, and molecular analysis of thirteen patients. *Am J Hum Genet* **73**(5): 1027-1040.
- Esplin ED, Li B, Slavotinek A, Novelli A, Battaglia A, Clark R, Curry C, Hudgins L. 2014. Nine patients with Xp22.31 microduplication, cognitive deficits, seizures, and talipes anomalies. *Am J Med Genet A*.
- Falettra F, D'Adamo AP, Santa Rocca M, Carrozzi M, Perrone MD, Pecile V, Gasparini P. 2012. Does the 1.5 Mb microduplication in chromosome band Xp22.31 have a pathogenetic role? New contribution and a review of the literature. *Am J Med Genet A* **158A**(2): 461-464.
- Falettra F, Devescovi R, Pecile V, Fabretto A, Carrozzi M, Gasparini P. 2011. A new case of duplication of the MDS region identified by high-density SNP arrays and a review of the literature. *J Appl Genet* **52**(1): 77-80.
- Fan Y, Qiu W, Wang L, Gu X, Yu Y. 2015. Exonic deletions of AUTS2 in Chinese patients with developmental delay and intellectual disability. *Am J Med Genet A*.
- Fan YS, Jayakar P, Zhu H, Barbouth D, Sacharow S, Morales A, Carver V, Benke P, Mundy P, Elsas LJ. 2007. Detection of pathogenic gene copy number variations in patients with mental retardation by genomewide oligonucleotide array comparative genomic hybridization. *Hum Mutat* **28**(11): 1124-1132.
- Fanizza I, Bertuzzo S, Beri S, Scalera E, Massagli A, Sali ME, Giorda R, Bonaglia MC. 2014. Genotype-phenotype relationship in a child with 2.3 Mb de novo interstitial 12p13.33-p13.32 deletion. *Eur J Med Genet* **57**(7): 334-338.
- Feenstra I, Fang J, Koolen DA, Siezen A, Evans C, Winter RM, Lees MM, Riegel M, de Vries BB, Van Ravenswaaij CM et al. 2006. European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations (ECARUCA); an online database for rare chromosome abnormalities. *Eur J Med Genet* **49**(4): 279-291.
- Fernandez-Jaen A, Castellanos Mdel C, Fernandez-Perrone AL, Fernandez-Mayoralas DM, de la Vega AG, Calleja-Perez B, Fernandez EC, Albert J, Hombre MC. 2014. Cerebral palsy, epilepsy, and severe intellectual disability in a patient with 3q29 microduplication syndrome. *Am J Med Genet A* **164A**(8): 2043-2047.
- Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, Joseph-George AM, Mackay S, Whitten K, Noble B et al. 2010. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet* **47**(3): 195-203.
- Fernandez L, Nevado J, Santos F, Heine-Suner D, Martinez-Glez V, Garcia-Minaur S, Palomo R, Delicado A, Pajares IL, Palomares M et al. 2009. A deletion and a duplication in distal 22q11.2 deletion syndrome region. Clinical implications and review. *BMC Med Genet* **10**: 48.
- Feuk L, Carson AR, Scherer SW. 2006. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* **7**(2): 85-97.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP et al. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* **36**(4): 361-374.
- Finelli P, Natacci F, Bonati MT, Gottardi G, Engelen JJ, de Die-Smulders CE, Sala M, Giardino D, Larizza L. 2004. FISH characterisation of an identical (16)(p11.2p12.2) tandem duplication in two unrelated patients with autistic behaviour. *J Med Genet* **41**(7): e90.

- Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, Van Vooren S, Moreau Y, Pettett RM, Carter NP. 2009. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet* **84**(4): 524-533.
- Folsom TD, Fatemi SH. 2013. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology* **68**: 122-135.
- Fontana P, Genesisio R, Casertano A, Cappuccio G, Mormile A, Nitsch L, Iolascon A, Andria G, Melis D. 2014. Loeys-Dietz syndrome type 4, caused by chromothripsis, involving the TGFB2 gene. *Gene* **538**(1): 69-73.
- Friedman JM, Baross A, Delaney AD, Ally A, Arbour L, Armstrong L, Asano J, Bailey DK, Barber S, Birch P et al. 2006. Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet* **79**(3): 500-513.
- Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P. 2007. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat* **28**(10): 1034-1042.
- Fullston T, Gabb B, Callen D, Ullmann R, Woollatt E, Bain S, Ropers HH, Cooper M, Chandler D, Carter K et al. 2011. Inherited balanced translocation t(9;17)(q33.2;q25.3) concomitant with a 16p13.1 duplication in a patient with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156**(2): 204-214.
- Furrow A, Theisen A, Velsher L, Bawle EV, Sastry S, Mendelsohn NJ, Jarvis K, Shaffer LG, Chitayat D. 2011. Duplication of the STS region in males is a benign copy-number variant. *Am J Med Genet A* **155A**(8): 1972-1975.
- Gai X, Xie HM, Perin JC, Takahashi N, Murphy K, Wenocur AS, D'Arcy M, O'Hara RJ, Goldmuntz E, Grice DE et al. 2012. Rare structural variation of synapse and neurotransmission genes in autism. *Mol Psychiatry* **17**(4): 402-411.
- Gandomi SK, Farwell Gonzalez KD, Parra M, Shahmirzadi L, Mancuso J, Pichurin P, Temme R, Dugan S, Zeng W, Tang S. 2014. Diagnostic exome sequencing identifies two novel IQSEC2 mutations associated with X-linked intellectual disability with seizures: implications for genetic counseling and clinical diagnosis. *Journal of genetic counseling* **23**(3): 289-298.
- Garcia-Minaur S, Fantes J, Murray RS, Porteous ME, Strain L, Burns JE, Stephen J, Warner JP. 2002. A novel atypical 22q11.2 distal deletion in father and son. *J Med Genet* **39**(10): E62.
- Garshasbi M, Hadavi V, Habibi H, Kahrizi K, Kariminejad R, Behjati F, Tzschach A, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. 2008. A defect in the TUSC3 gene is associated with autosomal recessive mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**(5): 1158-1164.
- Garshasbi M, Kahrizi K, Hosseini M, Nouri Vahid L, Falah M, Hemmati S, Hu H, Tzschach A, Ropers HH, Najmabadi H et al. 2011. A novel nonsense mutation in TUSC3 is responsible for non-syndromic autosomal recessive mental retardation in a consanguineous Iranian family. *Am J Med Genet A* **155A**(8): 1976-1980.
- Gazzellone MJ, Zhou X, Lionel AC, Uddin M, Thiruvahindrapuram B, Liang S, Sun C, Wang J, Zou M, Tammimies K et al. 2014. Copy number variation in Han Chinese individuals with autism spectrum disorder. *J Neurodev Disord* **6**(1): 34.
- Gecz J, Barnett S, Liu J, Hollway G, Donnelly A, Eyre H, Eshkevari HS, Baltazar R, Grunn A, Nagaraja R et al. 1999. Characterization of the human glutamate receptor subunit 3 gene (GRIA3), a candidate for bipolar disorder and nonspecific X-linked mental retardation. *Genomics* **62**(3): 356-368.

- Gecz J, Haan E. 2012. New mutations and sporadic intellectual disability. *Lancet* **380**(9854): 1630-1631.
- Geschwind DH. 2009. Advances in autism. *Annu Rev Med* **60**: 367-380.
- . 2011. Genetics of autism spectrum disorders. *Trends in cognitive sciences* **15**(9): 409-416.
- Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Thung DT, van de Vorst M, van Bon BW, Willemsen MH, Kwint M, Janssen IM, Hoischen A, Schenck A et al. 2014. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**(7509): 344-347.
- Gilman SR, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D. 2011. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* **70**(5): 898-907.
- Gillberg C, Cederlund M, Lamberg K, Zeijlon L. 2006. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* **36**(3): 429-435.
- Gillentine MA, Schaaf CP. 2015. The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number. *Biochemical pharmacology* **97**(4): 352-362.
- Gimelli S, Leoni M, Di Rocco M, Caridi G, Porta S, Cuoco C, Gimelli G, Tassano E. 2013. A rare 3q13.31 microdeletion including GAP43 and LSAMP genes. *Mol Cytogenet* **6**(1): 52.
- Girirajan S, Brkanac Z, Coe BP, Baker C, Vives L, Vu TH, Shafer N, Bernier R, Ferrero GB, Silengo M et al. 2011. Relative burden of large CNVs on a range of neurodevelopmental phenotypes. *PLoS Genet* **7**(11): e1002334.
- Girirajan S, Dennis MY, Baker C, Malig M, Coe BP, Campbell CD, Mark K, Vu TH, Alkan C, Cheng Z et al. 2013a. Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **92**(2): 221-237.
- Girirajan S, Eichler EE. 2010. Phenotypic variability and genetic susceptibility to genomic disorders. *Hum Mol Genet* **19**(R2): R176-187.
- Girirajan S, Johnson RL, Tassone F, Balciuniene J, Katiyar N, Fox K, Baker C, Srikanth A, Yeoh KH, Khoo SJ et al. 2013b. Global increases in both common and rare copy number load associated with autism. *Hum Mol Genet* **22**(14): 2870-2880.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Coe BP, Parikh S, Friedman N, Goldstein A, Filipink RA, McConnell JS, Angle B, Meschino WS et al. 2012. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* **367**(14): 1321-1331.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C et al. 2010. A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet* **42**(3): 203-209.
- Glessner JT, Wang K, Cai G, Korvatska O, Kim CE, Wood S, Zhang H, Estes A, Brune CW, Bradfield JP et al. 2009. Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* **459**(7246): 569-573.
- Goes FS, Hamshere ML, Seifuddin F, Pirooznia M, Belmonte-Mahon P, Breuer R, Schulze T, Nothen M, Cichon S, Rietschel M et al. 2012. Genome-wide association of mood-incongruent psychotic bipolar disorder. *Translational psychiatry* **2**: e180.
- Golzio C, Willer J, Talkowski ME, Oh EC, Taniguchi Y, Jacquemont S, Reymond A, Sun M, Sawa A, Gusella JF et al. 2012. KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* **485**(7398): 363-367.
- Grabrucker AM. 2012. Environmental factors in autism. *Frontiers in psychiatry* **3**: 118.

- Gregor A, Albrecht B, Bader I, Bijlsma EK, Ekici AB, Engels H, Hackmann K, Horn D, Hoyer J, Klapecki J et al. 2011. Expanding the clinical spectrum associated with defects in CNTNAP2 and NRXN1. *BMC Med Genet* **12**: 106.
- Griggs BL, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, Srivastava AK. 2008. Deducator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* **91**(2): 195-202.
- Griswold AJ, Ma D, Cukier HN, Nations LD, Schmidt MA, Chung RH, Jaworski JM, Salyakina D, Konidari I, Whitehead PL et al. 2012. Evaluation of copy number variations reveals novel candidate genes in autism spectrum disorder-associated pathways. *Hum Mol Genet* **21**(15): 3513-3523.
- Grotto S, Drouin-Garraud V, Ounap K, Puusepp-Benazzouz H, Schuurs-Hoeijmakers J, Le Meur N, Chambon P, Fehrenbach S, van Bokhoven H, Frebourg T et al. 2014. Clinical assessment of five patients with BRWD3 mutation at Xq21.1 gives further evidence for mild to moderate intellectual disability and macrocephaly. *Eur J Med Genet* **57**(5): 200-206.
- Gudjonsson T, Altmeyer M, Savic V, Toledo L, Dinant C, Grofte M, Bartkova J, Poulsen M, Oka Y, Bekker-Jensen S et al. 2012. TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* **150**(4): 697-709.
- Guilmatre A, Dubourg C, Mosca AL, Legallic S, Goldenberg A, Drouin-Garraud V, Layet V, Rosier A, Briault S, Bonnet-Brilhault F et al. 2009. Recurrent rearrangements in synaptic and neurodevelopmental genes and shared biologic pathways in schizophrenia, autism, and mental retardation. *Archives of general psychiatry* **66**(9): 947-956.
- Guilmatre A, Huguet G, Delorme R, Bourgeron T. 2014. The emerging role of SHANK genes in neuropsychiatric disorders. *Developmental neurobiology* **74**(2): 113-122.
- Hahn JS, Hanauer A. 2012. Stimulus-induced drop episodes in Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Med Genet* **55**(5): 335-337.
- Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, Miller J, Fedele A, Collins J, Smith K et al. 2011. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry* **68**(11): 1095-1102.
- Hamdan FF, Gauthier J, Araki Y, Lin DT, Yoshizawa Y, Higashi K, Park AR, Spiegelman D, Dobrzyniecka S, Piton A et al. 2011. Excess of de novo deleterious mutations in genes associated with glutamatergic systems in nonsyndromic intellectual disability. *Am J Hum Genet* **88**(3): 306-316.
- Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, Veenstra-Knol HE, Kerstjens-Frederikse WS, Herkert JC, Gerkes EH et al. 2012. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet* **20**(2): 161-165.
- Hannes FD, Sharp AJ, Mefford HC, de Ravel T, Ruivenkamp CA, Breuning MH, Fryns JP, Devriendt K, Van Buggenhout G, Vogels A et al. 2009. Recurrent reciprocal deletions and duplications of 16p13.11: the deletion is a risk factor for MR/MCA while the duplication may be a rare benign variant. *J Med Genet* **46**(4): 223-232.
- Harakalova M, van den Boogaard MJ, Sinke R, van Lieshout S, van Tuil MC, Duran K, Renkens I, Terhal PA, de Kovel C, Nijman IJ et al. 2012. X-exome sequencing identifies a HDAC8 variant in a large pedigree with X-linked intellectual disability, truncal obesity, gynaecomastia, hypogonadism and unusual face. *J Med Genet* **49**(8): 539-543.
- Hastings PJ, Ira G, Lupski JR. 2009. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet* **5**(1): e1000327.

- Hehir-Kwa JY, Egmont-Petersen M, Janssen IM, Smeets D, van Kessel AG, Veltman JA. 2007. Genome-wide copy number profiling on high-density bacterial artificial chromosomes, single-nucleotide polymorphisms, and oligonucleotide microarrays: a platform comparison based on statistical power analysis. *DNA Res* **14**(1): 1-11.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA. 2015. Exome sequencing and whole genome sequencing for the detection of copy number variation. *Expert Rev Mol Diagn* **15**(8): 1023-1032.
- Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. 2013. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet* **84**(5): 415-421.
- Hehir-Kwa JY, Wieskamp N, Webber C, Pfundt R, Brunner HG, Gilissen C, de Vries BB, Ponting CP, Veltman JA. 2010. Accurate distinction of pathogenic from benign CNVs in mental retardation. *PLoS Comput Biol* **6**(4): e1000752.
- Heinzen EL, Radtke RA, Urban TJ, Cavalleri GL, Depondt C, Need AC, Walley NM, Nicoletti P, Ge D, Catarino CB et al. 2010. Rare deletions at 16p13.11 predispose to a diverse spectrum of sporadic epilepsy syndromes. *Am J Hum Genet* **86**(5): 707-718.
- Heiskanen MA, Bittner ML, Chen Y, Khan J, Adler KE, Trent JM, Meltzer PS. 2000. Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays. *Cancer Res* **60**(4): 799-802.
- Helbig I, Hartmann C, Mefford HC. 2013. The unexpected role of copy number variations in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsy Behav* **28 Suppl 1**: S66-68.
- Helsmoortel C, Vandeweyer G, Ordoukhanian P, Van Nieuwerburgh F, Van der Aa N, Kooy RF. 2014. Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family-based whole-exome sequencing. *Clin Genet*.
- Hempel M, Rivera Bragues N, Wagenstaller J, Lederer G, Weitensteiner A, Seidel H, Meitinger T, Strom TM. 2009. Microdeletion syndrome 16p11.2-p12.2: clinical and molecular characterization. *Am J Med Genet A* **149A**(10): 2106-2112.
- Hernando C, Plaja A, Rigola MA, Perez MM, Vendrell T, Egocue J, Fuster C. 2002. Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations. *J Med Genet* **39**(5): E24.
- Hochstenbach R, Buizer-Voskamp JE, Vorstman JA, Ophoff RA. 2011. Genome arrays for the detection of copy number variations in idiopathic mental retardation, idiopathic generalized epilepsy and neuropsychiatric disorders: lessons for diagnostic workflow and research. *Cytogenet Genome Res* **135**(3-4): 174-202.
- Hochstenbach R, Poot M, Nijman IJ, Renkens I, Duran KJ, Van't Slot R, van Binsbergen E, van der Zwaag B, Vogel MJ, Terhal PA et al. 2012. Discovery of variants unmasked by hemizygous deletions. *Eur J Hum Genet* **20**(7): 748-753.
- Hochstenbach R, van Binsbergen E, Engelen J, Nieuwint A, Polstra A, Poddighe P, Ruivenkamp C, Sikkema-Raddatz B, Smeets D, Poot M. 2009. 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* **52**(4): 161-169.
- Hu H, Haas SA, Chelly J, Van Esch H, Raynaud M, de Brouwer AP, Weinert S, Froyen G, Frints SG, Laumonnier F et al. 2015. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol Psychiatry*.
- Hu H, Wrogemann K, Kalscheuer V, Tzschach A, Richard H, Haas SA, Menzel C, Bienek M, Froyen G, Raynaud M et al. 2009a. Erratum to: Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* **3**(1-4): 83.

- . 2009b. Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *Hugo J* **3**(1-4): 41-49.
- Huang XL, Zou YS, Maher TA, Newton S, Milunsky JM. 2010. A de novo balanced translocation breakpoint truncating the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with autism. *Am J Med Genet A* **152A**(8): 2112-2114.
- Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C. 2004. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* **36**(9): 949-951.
- Ikeda M, Tomita Y, Mouri A, Koga M, Okochi T, Yoshimura R, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Hashimoto R, Williams HJ et al. 2010. Identification of novel candidate genes for treatment response to risperidone and susceptibility for schizophrenia: integrated analysis among pharmacogenomics, mouse expression, and genetic case-control association approaches. *Biol Psychiatry* **67**(3): 263-269.
- Ikeda T, Zhang J, Chano T, Mabuchi A, Fukuda A, Kawaguchi H, Nakamura K, Ikegawa S. 2002. Identification and characterization of the human long form of Sox5 (L-SOX5) gene. *Gene* **298**(1): 59-68.
- Imitola J, Walleigh D, Anderson CE, Jethva R, Carvalho KS, Legido A, Khurana DS. 2014. Fraternal twins with autism, severe cognitive deficit, and epilepsy: diagnostic role of chromosomal microarray analysis. *Seminars in pediatric neurology* **21**(2): 167-171.
- Ingason A, Rujescu D, Cichon S, Sigurdsson E, Sigmundsson T, Pietilainen OP, Buizer-Voskamp JE, Strengman E, Francks C, Muglia P et al. 2011. Copy number variations of chromosome 16p13.1 region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **16**(1): 17-25.
- International HapMap C. 2003. The International HapMap Project. *Nature* **426**(6968): 789-796.
- . 2005. A haplotype map of the human genome. *Nature* **437**(7063): 1299-1320.
- Iossifov I, O'Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE et al. 2014. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**(7526): 216-221.
- Iossifov I, Ronemus M, Levy D, Wang Z, Hakker I, Rosenbaum J, Yamrom B, Lee YH, Narzisi G, Leotta A et al. 2012. De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* **74**(2): 285-299.
- Iqbal Z, van Bokhoven H. 2014. Identifying genes responsible for intellectual disability in consanguineous families. *Human heredity* **77**(1-4): 150-160.
- Iqbal Z, Willemsen MH, Papon MA, Musante L, Benevento M, Hu H, Venselaar H, Wissink-Lindhout WM, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE et al. 2015. Homozygous SLC6A17 mutations cause autosomal-recessive intellectual disability with progressive tremor, speech impairment, and behavioral problems. *Am J Hum Genet* **96**(3): 386-396.
- Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA et al. 2004. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* **36**(3): 299-303.
- Isrie M, Froyen G, Devriendt K, de Ravel T, Fryns JP, Vermeesch JR, Van Esch H. 2012. Sporadic male patients with intellectual disability: contribution of X-chromosome copy number variants. *Eur J Med Genet* **55**(11): 577-585.
- Isrie M, Zamani Esteki M, Peeters H, Voet T, Van Houdt J, Van Paesschen W, Van Esch H. 2015. Homozygous missense mutation in STYXL1 associated with moderate intellectual disability, epilepsy and behavioural complexities. *Eur J Med Genet* **58**(4): 205-210.

- Itsara A, Wu H, Smith JD, Nickerson DA, Romieu I, London SJ, Eichler EE. 2010. De novo rates and selection of large copy number variation. *Genome Res* **20**(11): 1469-1481.
- Jacobs PA, Baikie AG, Court Brown WM, Strong JA. 1959. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet* **1**(7075): 710.
- Jacquemont ML, Sanlaville D, Redon R, Raoul O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Amiel J, Le Merrer M, Heron D, de Blois MC et al. 2006. Array-based comparative genomic hybridisation identifies high frequency of cryptic chromosomal rearrangements in patients with syndromic autism spectrum disorders. *J Med Genet* **43**(11): 843-849.
- Jaillard S, Dubourg C, Gerard-Blanluet M, Delahaye A, Pasquier L, Dupont C, Henry C, Tabet AC, Lucas J, Aboura A et al. 2009. 2q23.1 microdeletion identified by array comparative genomic hybridisation: an emerging phenotype with Angelman-like features? *J Med Genet* **46**(12): 847-855.
- Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C et al. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* **34**(1): 27-29.
- Jiang YH, Yuen RK, Jin X, Wang M, Chen N, Wu X, Ju J, Mei J, Shi Y, He M et al. 2013. Detection of clinically relevant genetic variants in autism spectrum disorder by whole-genome sequencing. *Am J Hum Genet* **93**(2): 249-263.
- Jolley A, Corbett M, McGregor L, Waters W, Brown S, Nicholl J, Yu S. 2013. De novo intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) gene in a patient with developmental delay: a case report and literature review. *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1508-1512.
- Jurkiewicz D, Jezela-Stanek A, Ciara E, Piekutowska-Abramczuk D, Kugauto M, Gajdulewicz M, Chrzanoska K, Popowska E, Krajewska-Walasek M. 2010. Four novel RSK2 mutations in females with Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Med Genet* **53**(5): 268-273.
- Kajiro M, Tsuchiya M, Kawabe Y, Furumai R, Iwasaki N, Hayashi Y, Katano M, Nakajima Y, Goto N, Watanabe T et al. 2011. The E3 ubiquitin ligase activity of Trip12 is essential for mouse embryogenesis. *PLoS One* **6**(10): e25871.
- Kalscheuer VM, FitzPatrick D, Tommerup N, Bugge M, Niebuhr E, Neumann LM, Tzschach A, Shoichet SA, Menzel C, Erdogan F et al. 2007. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) in patients with mental retardation. *Hum Genet* **121**(3-4): 501-509.
- Kalsner L, Chamberlain SJ. 2015. Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 Duplication Syndromes. *Pediatric clinics of North America* **62**(3): 587-606.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**(5083): 818-821.
- Kaminsky EB, Kaul V, Paschall J, Church DM, Bunke B, Kunig D, Moreno-De-Luca D, Moreno-De-Luca A, Mulle JG, Warren ST et al. 2011. An evidence-based approach to establish the functional and clinical significance of copy number variants in intellectual and developmental disabilities. *Genet Med* **13**(9): 777-784.
- Karavitakis E, Kitsiou-Tzeli S, Xaidara A, Kosma K, Makrythanasis P, Apazidou E, Kanavakis E, Tzetzis M. 2014. Microduplication 3q13.2q13.31 identified in a male with dysmorphic features and multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet A* **164A**(3): 666-670.
- Kashevarova AA, Nazarenko LP, Skryabin NA, Salyukova OA, Chechetkina NN, Tolmacheva EN, Sazhenova EA, Magini P, Graziano C, Romeo G et al. 2014. Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. *Gene* **536**(1): 145-150.

- Kaufman L, Ayub M, Vincent JB. 2010. The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review. *J Neurodev Disord* **2**(4): 182-209.
- Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance C. 2011. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* **13**(7): 680-685.
- Kenny EM, Cormican P, Furlong S, Heron E, Kenny G, Fahey C, Kelleher E, Ennis S, Tropea D, Anney R et al. 2013. Excess of rare novel loss-of-function variants in synaptic genes in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*.
- Khan MA, Rafiq MA, Noor A, Ali N, Ali G, Vincent JB, Ansar M. 2011. A novel deletion mutation in the TUSC3 gene in a consanguineous Pakistani family with autosomal recessive nonsyndromic intellectual disability. *BMC Med Genet* **12**: 56.
- Kirchhoff M, Rose H, Lundsteen C. 2001. High resolution comparative genomic hybridisation in clinical cytogenetics. *J Med Genet* **38**(11): 740-744.
- Kirchhoff M, Rose H, Maahr J, Gerdes T, Bugge M, Tommerup N, Tumer Z, Lespinasse J, Jensen PK, Wirth J et al. 2000. High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *Eur J Hum Genet* **8**(9): 661-668.
- Kirov G, Rees E, Walters JT, Escott-Price V, Georgieva L, Richards AL, Chambert KD, Davies G, Legge SE, Moran JL et al. 2013. The Penetrance of Copy Number Variations for Schizophrenia and Developmental Delay. *Biol Psychiatry*.
- Knijnenburg J, Oberstein SA, Frei K, Lucas T, Gijsbers AC, Ruivenkamp CA, Tanke HJ, Szuhai K. 2009. A homozygous deletion of a normal variation locus in a patient with hearing loss from non-consanguineous parents. *J Med Genet* **46**(6): 412-417.
- Kolanczyk M, Krawitz P, Hecht J, Hupalowska A, Miaczynska M, Marschner K, Schlack C, Emmerich D, Kobus K, Kornak U et al. 2015. Missense variant in CCDC22 causes X-linked recessive intellectual disability with features of Ritscher-Schinzel/3C syndrome. *Eur J Hum Genet* **23**(5): 633-638.
- Koolen DA, Pfundt R, de Leeuw N, Hehir-Kwa JY, Nillesen WM, Neefs I, Scheltinga I, Sistermans E, Smeets D, Brunner HG et al. 2009. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat* **30**(3): 283-292.
- Koolen DA, Vissers LE, Nillesen W, Smeets D, van Ravenswaaij CM, Sistermans EA, Veltman JA, de Vries BB. 2004. A novel microdeletion, del(2)(q22.3q23.3) in a mentally retarded patient, detected by array-based comparative genomic hybridization. *Clin Genet* **65**(5): 429-432.
- Kortum F, Caputo V, Bauer CK, Stella L, Ciolfi A, Alawi M, Bocchinfuso G, Flex E, Paolacci S, Dentici ML et al. 2015. Mutations in KCNH1 and ATP6V1B2 cause Zimmermann-Laband syndrome. *Nat Genet* **47**(6): 661-667.
- Kou Y, Betancur C, Xu H, Buxbaum JD, Ma'ayan A. 2012. Network- and attribute-based classifiers can prioritize genes and pathways for autism spectrum disorders and intellectual disability. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **160C**(2): 130-142.
- Kozłowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. 2008. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* **29**(23): 4627-4636.
- Kreis P, Barnier JV. 2009. PAK signalling in neuronal physiology. *Cell Signal* **21**(3): 384-393.

- Kropp M, Wilson SI. 2012. The expression profile of the tumor suppressor gene *Lzts1* suggests a role in neuronal development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **241**(5): 984-994.
- Krumm N, O'Roak BJ, Karakoc E, Mohajeri K, Nelson B, Vives L, Jacquemont S, Munson J, Bernier R, Eichler EE. 2013. Transmission disequilibrium of small CNVs in simplex autism. *Am J Hum Genet* **93**(4): 595-606.
- Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, Raja A, Coe BP, Stessman HA, He ZX et al. 2015. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nat Genet* **47**(6): 582-588.
- Kumar RA, Christian SL. 2009. Genetics of autism spectrum disorders. *Current neurology and neuroscience reports* **9**(3): 188-197.
- Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, Conrad DF, Brune C, Badner JA, Gilliam TC, Nowak NJ, Cook EH, Jr., Dobyns WB et al. 2008. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* **17**(4): 628-638.
- Kuss AW, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Behjati F, Darvish H, Abbasi-Moheb L, Puettmann L, Zecha A, Weissmann R et al. 2011. Autosomal recessive mental retardation: homozygosity mapping identifies 27 single linkage intervals, at least 14 novel loci and several mutation hotspots. *Hum Genet* **129**(2): 141-148.
- Kwan KY, Lam MM, Krsnik Z, Kawasawa YI, Lefebvre V, Sestan N. 2008. SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(41): 16021-16026.
- Ladha S. 2012. Getting to the bottom of autism spectrum and related disorders: MBD5 as a key contributor. *Clin Genet* **81**(4): 363-364.
- Laget S, Joulie M, Le Masson F, Sasai N, Christians E, Pradhan S, Roberts RJ, Defossez PA. 2010. The human proteins MBD5 and MBD6 associate with heterochromatin but they do not bind methylated DNA. *PLoS One* **5**(8): e11982.
- Lai T, Jabaudon D, Molyneaux BJ, Azim E, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. 2008. SOX5 controls the sequential generation of distinct corticofugal neuron subtypes. *Neuron* **57**(2): 232-247.
- Lamb AN, Rosenfeld JA, Neill NJ, Talkowski ME, Blumenthal I, Girirajan S, Keelean-Fuller D, Fan Z, Pouncey J, Stevens C et al. 2012. Haploinsufficiency of SOX5 at 12p12.1 is associated with developmental delays with prominent language delay, behavior problems, and mild dysmorphic features. *Hum Mutat* **33**(4): 728-740.
- Lammert DB, Howell BW. 2016. RELN Mutations in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in cellular neuroscience* **10**: 84.
- Lasky-Su J, Neale BM, Franke B, Anney RJ, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Chen W, Asherson P, Buitelaar J et al. 2008. Genome-wide association scan of quantitative traits for attention deficit hyperactivity disorder identifies novel associations and confirms candidate gene associations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**(8): 1345-1354.
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lecomte E, Calvas P et al. 2004. X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* **74**(3): 552-557.
- Leal T, Andrieux J, Duban-Bedu B, Bouquillon S, Breviere GM, Delobel B. 2009. Array-CGH detection of a de novo 0.8Mb deletion in 19q13.32 associated with mental retardation, cardiac malformation, cleft lip and palate, hearing loss and multiple dysmorphic features. *Eur J Med Genet* **52**(1): 62-66.

- Leblond CS, Heinrich J, Delorme R, Proepper C, Betancur C, Huguet G, Konyukh M, Chaste P, Ey E, Rastam M et al. 2012. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet* **8**(2): e1002521.
- Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Huguet G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K et al. 2014. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet* **10**(9): e1004580.
- Lee C, Scherer SW. 2010. The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev Mol Med* **12**: e8.
- Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR. 2007. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell* **131**(7): 1235-1247.
- Lee JA, Inoue K, Cheung SW, Shaw CA, Stankiewicz P, Lupski JR. 2006. Role of genomic architecture in PLP1 duplication causing Pelizaeus-Merzbacher disease. *Hum Mol Genet* **15**(14): 2250-2265.
- Lee JR. 2015. Protein tyrosine phosphatase PTPRT as a regulator of synaptic formation and neuronal development. *BMB reports* **48**(5): 249-255.
- Lee JT, Bartolomei MS. 2013. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* **152**(6): 1308-1323.
- Lee JY, Kwak M, Lee PC. 2015. Impairment of social behavior and communication in mice lacking the Uba6-dependent ubiquitin activation system. *Behavioural brain research* **281**: 78-85.
- Lee PC, Dodart JC, Aron L, Finley LW, Bronson RT, Haigis MC, Yankner BA, Harper JW. 2013a. Altered social behavior and neuronal development in mice lacking the Uba6-Use1 ubiquitin transfer system. *Molecular cell* **50**(2): 172-184.
- Lee RW, Bodurtha J, Cohen J, Fatemi A, Batista D. 2013b. Deletion 12p12 involving SOX5 in two children with developmental delay and dysmorphic features. *Pediatr Neurol* **48**(4): 317-320.
- Lefebvre V. 2010. The SoxD transcription factors--Sox5, Sox6, and Sox13--are key cell fate modulators. *Int J Biochem Cell Biol* **42**(3): 429-432.
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* **17**(19): 5718-5733.
- Leonard H, Wen X. 2002. The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews* **8**(3): 117-134.
- Lepichon JB, Bittel DC, Graf WD, Yu S. 2010. A 15q13.3 homozygous microdeletion associated with a severe neurodevelopmental disorder suggests putative functions of the TRPM1, CHRNA7, and other homozygously deleted genes. *Am J Med Genet A* **152A**(5): 1300-1304.
- Letra A, Menezes R, Fonseca RF, Govil M, McHenry T, Murphy MJ, Hennebold JD, Granjeiro JM, Castilla EE, Orioli IM et al. 2010. Novel cleft susceptibility genes in chromosome 6q. *Journal of dental research* **89**(9): 927-932.
- Levy D, Ronemus M, Yamrom B, Lee YH, Leotta A, Kendall J, Marks S, Lakshmi B, Pai D, Ye K et al. 2011. Rare de novo and transmitted copy-number variation in autistic spectrum disorders. *Neuron* **70**(5): 886-897.
- Li D, Tekin M, Buch M, Fan YS. 2012. Co-existence of other copy number variations with 22q11.2 deletion or duplication: a modifier for variable phenotypes of the syndrome? *Mol Cytogenet* **5**(1): 18.

- Li F, Shen Y, Kohler U, Sharkey FH, Menon D, Coulleaux L, Malan V, Rio M, McMullan DJ, Cox H et al. 2010. Interstitial microduplication of Xp22.31: Causative of intellectual disability or benign copy number variant? *Eur J Med Genet* **53**(2): 93-99.
- Lichtenstein P, Carlstrom E, Rastam M, Gillberg C, Anckarsater H. 2010. The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry* **167**(11): 1357-1363.
- Lim ET, Raychaudhuri S, Sanders SJ, Stevens C, Sabo A, MacArthur DG, Neale BM, Kirby A, Ruderfer DM, Fromer M et al. 2013. Rare complete knockouts in humans: population distribution and significant role in autism spectrum disorders. *Neuron* **77**(2): 235-242.
- Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJ, Fishman EK, Chen Y, Myers L et al. 2012. Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet* **44**(8): 922-927.
- Liu JY, Kasperaviciute D, Martinian L, Thom M, Sisodiya SM. 2012. Neuropathology of 16p13.11 deletion in epilepsy. *PLoS One* **7**(4): e34813.
- Liu P, Erez A, Nagamani SC, Bi W, Carvalho CM, Simmons AD, Wiszniewska J, Fang P, Eng PA, Cooper ML et al. 2011. Copy number gain at Xp22.31 includes complex duplication rearrangements and recurrent triplications. *Hum Mol Genet* **20**(10): 1975-1988.
- Liu T, Elmquist JK, Williams KW. 2013. Mrap2: an accessory protein linked to obesity. *Cell metabolism* **18**(3): 309-311.
- Liu Y, Zhao D, Dong R, Yang X, Zhang Y, Tammimies K, Uddin M, Scherer SW, Gai Z. 2015. De novo exon 1 deletion of AUTS2 gene in a patient with autism spectrum disorder and developmental delay: A case report and a brief literature review. *Am J Med Genet A*.
- Loddo S, Parisi V, Doccini V, Filippi T, Bernardini L, Brovedani P, Ricci F, Novelli A, Battaglia A. 2013. Homozygous deletion in TUSC3 causing syndromic intellectual disability: a new patient. *Am J Med Genet A* **161A**(8): 2084-2087.
- Loftus BJ, Kim UJ, Sneddon VP, Kalush F, Brandon R, Fuhrmann J, Mason T, Crosby ML, Barnstead M, Cronin L et al. 1999. Genome duplications and other features in 12 Mb of DNA sequence from human chromosome 16p and 16q. *Genomics* **60**(3): 295-308.
- Lohoff FW. 2010. Genetic variants in the vesicular monoamine transporter 1 (VMAT1/SLC18A1) and neuropsychiatric disorders. *Methods Mol Biol* **637**: 165-180.
- Lohoff FW, Weller AE, Bloch PJ, Buono RJ, Doyle GA, Ferraro TN, Berrettini WH. 2008. Association between polymorphisms in the vesicular monoamine transporter 1 gene (VMAT1/SLC18A1) on chromosome 8p and schizophrenia. *Neuropsychobiology* **57**(1-2): 55-60.
- Lowther C, Costain G, Melvin R, Stavropoulos DJ, Lionel AC, Marshall CR, Scherer SW, Bassett AS. 2014. Adult expression of a 3q13.31 microdeletion. *Mol Cytogenet* **7**(1): 23.
- Lowther C, Speevak M, Armour CM, Goh ES, Graham GE, Li C, Zeesman S, Nowaczyk MJ, Schultz LA, Morra A et al. 2016. Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genet Med*.
- Lu AT, Dai X, Martinez-Agosto JA, Cantor RM. 2012. Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Molecular autism* **3**(1): 18.
- Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Stankiewicz P, Kang SH et al. 2008. Genomic imbalances in neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* **122**(6): 1310-1318.

- Luo X, Huang L, Han L, Luo Z, Hu F, Tieu R, Gan L. 2014. Systematic prioritization and integrative analysis of copy number variations in schizophrenia reveal key schizophrenia susceptibility genes. *Schizophr Bull* **40**(6): 1285-1299.
- Lupski JR. 2007. Structural variation in the human genome. *N Engl J Med* **356**(11): 1169-1171.
- Ma D, Salyakina D, Jaworski JM, Konidari I, Whitehead PL, Andersen AN, Hoffman JD, Slifer SH, Hedges DJ, Cukier HN et al. 2009. A genome-wide association study of autism reveals a common novel risk locus at 5p14.1. *Annals of human genetics* **73**(Pt 3): 263-273.
- Macdonald AH, Rodriguez L, Acena I, Martinez-Fernandez ML, Sanchez-Izquierdo D, Zuazo E, Martinez-Frias ML. 2010. Subtelomeric deletion of 12p: Description of a third case and review. *Am J Med Genet A* **152A**(6): 1561-1566.
- MacDonald JR, Ziman R, Yuen RK, Feuk L, Scherer SW. 2014. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res* **42**(Database issue): D986-992.
- Madrigal I, Martinez M, Rodriguez-Revenga L, Carrio A, Mila M. 2012. 12p13 rearrangements: 6 Mb deletion responsible for ID/MCA and reciprocal duplication without clinical responsibility. *Am J Med Genet A* **158A**(5): 1071-1076.
- Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Armengol L, Gonzalez E, Rodriguez B, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Guitart M, Fernandez I et al. 2007. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics* **8**: 443.
- Malhotra D, Sebat J. 2012. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* **148**(6): 1223-1241.
- Mann K, Ogilvie CM. 2012. QF-PCR: application, overview and review of the literature. *Prenat Diagn* **32**(4): 309-314.
- Mantripragada KK, Tapia-Paez I, Blennow E, Nilsson P, Wedell A, Dumanski JP. 2004. DNA copy-number analysis of the 22q11 deletion-syndrome region using array-CGH with genomic and PCR-based targets. *Int J Mol Med* **13**(2): 273-279.
- Marques Pereira P, Heron D, Hanauer A. 2007. The first large duplication of the RSK2 gene identified in a Coffin-Lowry syndrome patient. *Hum Genet* **122**(5): 541-543.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y et al. 2008. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **82**(2): 477-488.
- Marshall CR, Scherer SW. 2012. Detection and characterization of copy number variation in autism spectrum disorder. *Methods Mol Biol* **838**: 115-135.
- Martin J Han C Gordon LA Terry A Prabhakar S She X Xie G Hellsten U Chan YM Altherr M et al. 2004. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature* **432**(7020): 988-994.
- Martinez-Garay I, Ballesta MJ, Oltra S, Orellana C, Palomeque A, Molto MD, Prieto F, Martinez F. 2003. Intronic L1 insertion and F268S, novel mutations in RPS6KA3 (RSK2) causing Coffin-Lowry syndrome. *Clin Genet* **64**(6): 491-496.
- Mas S, Plana MT, Castro-Fornieles J, Gasso P, Lafuente A, Moreno E, Martinez E, Mila M, Lazaro L. 2013. Common genetic background in anorexia nervosa and obsessive compulsive disorder: preliminary results from an association study. *J Psychiatr Res* **47**(6): 747-754.
- Mastrangelo M. 2015. Novel Genes of Early-Onset Epileptic Encephalopathies: From Genotype to Phenotypes. *Pediatr Neurol* **53**(2): 119-129.

- Mastrangelo M, Leuzzi V. 2012. Genes of early-onset epileptic encephalopathies: from genotype to phenotype. *Pediatr Neurol* **46**(1): 24-31.
- Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM. 2013. Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the EPHA5 gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet A* **161A**(8): 1923-1928.
- Matsunami N, Hadley D, Hensel CH, Christensen GB, Kim C, Frackelton E, Thomas K, da Silva RP, Stevens J, Baird L et al. 2013. Identification of rare recurrent copy number variants in high-risk autism families and their prevalence in a large ASD population. *PLoS One* **8**(1): e52239.
- Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S. 2011. Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Research in developmental disabilities* **32**(2): 419-436.
- Maussion G, Carayol J, Lepagnol-Bestel AM, Tores F, Loe-Mie Y, Milbreta U, Rousseau F, Fontaine K, Renaud J, Moalic JM et al. 2008. Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism. *Hum Mol Genet* **17**(16): 2541-2551.
- McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, Addington AM, McClellan J, Yoon S, Perkins DO, Dickel DE, Kusenda M, Krastoshevsky O et al. 2009. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* **41**(11): 1223-1227.
- McDonald-McGinn DM, Fahiminiya S, Revil T, Nowakowska BA, Suhl J, Bailey A, Mlynarski E, Lynch DR, Yan AC, Bilaniuk LT et al. 2013. Hemizygous mutations in SNAP29 unmask autosomal recessive conditions and contribute to atypical findings in patients with 22q11.2DS. *J Med Genet* **50**(2): 80-90.
- McInerney-Leo AM, Sparrow DB, Harris JE, Gardiner BB, Marshall MS, O'Reilly VC, Shi H, Brown MA, Leo PJ, Zankl A et al. 2014. Compound heterozygous mutations in RIPPLY2 associated with vertebral segmentation defects. *Hum Mol Genet*.
- McMullan TW, Crolla JA, Gregory SG, Carter NP, Cooper RA, Howell GR, Robinson DO. 2002. A candidate gene for congenital bilateral isolated ptosis identified by molecular analysis of a de novo balanced translocation. *Hum Genet* **110**(3): 244-250.
- Mefford HC, Batshaw ML, Hoffman EP. 2012. Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med* **366**(8): 733-743.
- Mefford HC, Cooper GM, Zerr T, Smith JD, Baker C, Shafer N, Thorland EC, Skinner C, Schwartz CE, Nickerson DA et al. 2009. A method for rapid, targeted CNV genotyping identifies rare variants associated with neurocognitive disease. *Genome Res* **19**(9): 1579-1585.
- Mefford HC, Muhle H, Ostertag P, von Spiczak S, Buysse K, Baker C, Franke A, Malafosse A, Genton P, Thomas P et al. 2010. Genome-wide copy number variation in epilepsy: novel susceptibility loci in idiopathic generalized and focal epilepsies. *PLoS Genet* **6**(5): e1000962.
- Menashe I, Larsen EC, Banerjee-Basu S. 2013. Prioritization of Copy Number Variation Loci Associated with Autism from AutDB-An Integrative Multi-Study Genetic Database. *PLoS One* **8**(6): e66707.
- Mencarelli MA, Katzaki E, Papa FT, Sampieri K, Caselli R, Uliana V, Pollazzon M, Canitano R, Mostardini R, Grosso S et al. 2008. Private inherited microdeletion/microduplications: implications in clinical practice. *Eur J Med Genet* **51**(5): 409-416.
- Michaelson JJ, Shi Y, Gujral M, Zheng H, Malhotra D, Jin X, Jian M, Liu G, Greer D, Bhandari A et al. 2012. Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell* **151**(7): 1431-1442.

- Mignon-Ravix C, Cacciagli P, Choucair N, Popovici C, Missirian C, Milh M, Megarbane A, Busa T, Julia S, Girard N et al. 2014. Intragenic rearrangements in X-linked intellectual deficiency: results of a-CGH in a series of 54 patients and identification of TRPC5 and KLHL15 as potential XLID genes. *Am J Med Genet A* **164A**(8): 1991-1997.
- Mikhail FM, Lose EJ, Robin NH, Descartes MD, Rutledge KD, Rutledge SL, Korf BR, Carroll AJ. 2011. Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders. *Am J Med Genet A* **155A**(10): 2386-2396.
- Miles JH. 2011. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genet Med* **13**(4): 278-294.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ et al. 2010. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet* **86**(5): 749-764.
- Molck MC, Vieira TP, Simioni M, Sgardlioli IC, dos Santos AP, Xavier AC, Gil-da-Silva-Lopes VL. 2015. Distal 22q11.2 microduplication combined with typical 22q11.2 proximal deletion: a case report. *Am J Med Genet A* **167A**(1): 215-220.
- Molin AM, Andrieux J, Koolen DA, Malan V, Carella M, Colleaux L, Cormier-Daire V, David A, de Leeuw N, Delobel B et al. 2012. A novel microdeletion syndrome at 3q13.31 characterised by developmental delay, postnatal overgrowth, hypoplastic male genitals, and characteristic facial features. *J Med Genet* **49**(2): 104-109.
- Molinari F, Foulquier F, Tarpey PS, Morelle W, Boissel S, Teague J, Edkins S, Futreal PA, Stratton MR, Turner G et al. 2008. Oligosaccharyltransferase-subunit mutations in nonsyndromic mental retardation. *Am J Hum Genet* **82**(5): 1150-1157.
- Moncini S, Bedeschi MF, Castronovo P, Crippa M, Calvello M, Garghentino RR, Scuvera G, Finelli P, Venturin M. 2013. ATRX mutation in two adult brothers with non-specific moderate intellectual disability identified by exome sequencing. *Meta gene* **1**: 102-108.
- Morimoto M, Sasaki N, Oginuma M, Kiso M, Igarashi K, Aizaki K, Kanno J, Saga Y. 2007. The negative regulation of Mesp2 by mouse Ripply2 is required to establish the rostro-caudal patterning within a somite. *Development* **134**(8): 1561-1569.
- Motobayashi M, Nishimura-Tadaki A, Inaba Y, Kosho T, Miyatake S, Niimi T, Nishimura T, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N et al. 2012. Neurodevelopmental features in 2q23.1 microdeletion syndrome: report of a new patient with intractable seizures and review of literature. *Am J Med Genet A* **158A**(4): 861-868.
- Mullegama SV, Rosenfeld JA, Orellana C, van Bon BW, Halbach S, Repnikova EA, Brick L, Li C, Dupuis L, Rosello M et al. 2014. Reciprocal deletion and duplication at 2q23.1 indicates a role for MBD5 in autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet* **22**(1): 57-63.
- Nagamani SC, Erez A, Bader P, Lalani SR, Scott DA, Scaglia F, Plon SE, Tsai CH, Reimschisel T, Roeder E et al. 2010. Phenotypic manifestations of copy number variation in chromosome 16p13.11. *Eur J Hum Genet* **19**(3): 280-286.
- Nagamani SC, Erez A, Ben-Zeev B, Frydman M, Winter S, Zeller R, El-Khechen D, Escobar L, Stankiewicz P, Patel A et al. 2012. Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*.
- Najmabadi H, Hu H, Garshasbi M, Zemojtel T, Abedini SS, Chen W, Hosseini M, Behjati F, Haas S, Jamali P et al. 2011. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* **478**(7367): 57-63.

- Najmabadi H, Motazacker MM, Garshasbi M, Kahrizi K, Tzschach A, Chen W, Behjati F, Hadavi V, Nieh SE, Abedini SS et al. 2007. Homozygosity mapping in consanguineous families reveals extreme heterogeneity of non-syndromic autosomal recessive mental retardation and identifies 8 novel gene loci. *Hum Genet* **121**(1): 43-48.
- Nakamura M, Yamagata T, Mori M, Momoi MY. 2005. RSK2 gene mutations in Coffin-Lowry syndrome with drop episodes. *Brain Dev* **27**(2): 114-117.
- Nava C, Keren B, Mignot C, Rastetter A, Chantot-Bastaraud S, Faudet A, Fonteneau E, Amiet C, Laurent C, Jacquette A et al. 2014. Prospective diagnostic analysis of copy number variants using SNP microarrays in individuals with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **22**(1): 71-78.
- Nava C, Lamari F, Heron D, Mignot C, Rastetter A, Keren B, Cohen D, Faudet A, Bouteiller D, Gilleron M et al. 2012. Analysis of the chromosome X exome in patients with autism spectrum disorders identified novel candidate genes, including TMLHE. *Translational psychiatry* **2**: e179.
- Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V et al. 2012. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* **485**(7397): 242-245.
- Neill NJ, Ballif BC, Lamb AN, Parikh S, Ravnan JB, Schultz RA, Torchia BS, Rosenfeld JA, Shaffer LG. 2011. Recurrence, submicroscopic complexity, and potential clinical relevance of copy gains detected by array CGH that are shown to be unbalanced insertions by FISH. *Genome Res* **21**(4): 535-544.
- Niranjan TS, Skinner C, May M, Turner T, Rose R, Stevenson R, Schwartz CE, Wang T. 2015. Affected kindred analysis of human X chromosome exomes to identify novel X-linked intellectual disability genes. *PLoS One* **10**(2): e0116454.
- Nishimoto HK, Ha K, Jones JR, Dwivedi A, Cho HM, Layman LC, Kim HG. 2014. The historical Coffin-Lowry syndrome family revisited: identification of two novel mutations of RPS6KA3 in three male patients. *Am J Med Genet A* **164A**(9): 2172-2179.
- Nishioka M, Bundo M, Koike S, Takizawa R, Kakiuchi C, Araki T, Kasai K, Iwamoto K. 2013. Comprehensive DNA methylation analysis of peripheral blood cells derived from patients with first-episode schizophrenia. *J Hum Genet* **58**(2): 91-97.
- Noh GJ, Graham JM, Jr. 2012. 2q23.1 microdeletion of the MBD5 gene in a female with seizures, developmental delay and distinct dysmorphic features. *Eur J Med Genet* **55**(5): 354-357.
- Noh HJ, Ponting CP, Boulding HC, Meader S, Betancur C, Buxbaum JD, Pinto D, Marshall CR, Lionel AC, Scherer SW et al. 2013. Network topologies and convergent aetiologies arising from deletions and duplications observed in individuals with autism. *PLoS Genet* **9**(6): e1003523.
- Notini AJ, Craig JM, White SJ. 2008. Copy number variation and mosaicism. *Cytogenet Genome Res* **123**(1-4): 270-277.
- Nowakowska BA, de Leeuw N, Ruivenkamp CA, Sikkema-Raddatz B, Crolla JA, Thoelen R, Koopmans M, den Hollander N, van Haeringen A, van der Kevie-Kersemaekers AM et al. 2012. Parental insertional balanced translocations are an important cause of apparently de novo CNVs in patients with developmental anomalies. *Eur J Hum Genet* **20**(2): 166-170.
- O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, Karakoc E, Mackenzie AP, Ng SB, Baker C et al. 2011. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* **43**(6): 585-589.

- O'Roak BJ, Stessman HA, Boyle EA, Witherspoon KT, Martin B, Lee C, Vives L, Baker C, Hiatt JB, Nickerson DA et al. 2014. Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nature communications* **5**: 5595.
- O'Roak BJ, Vives L, Fu W, Egertson JD, Stanaway IB, Phelps IG, Carvill G, Kumar A, Lee C, Ankenman K et al. 2012a. Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science* **338**(6114): 1619-1622.
- O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD et al. 2012b. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* **485**(7397): 246-250.
- Oades RD, Lasky-Su J, Christiansen H, Faraone SV, Sonuga-Barke EJ, Banaschewski T, Chen W, Anney RJ, Buitelaar JK, Ebstein RP et al. 2008. The influence of serotonin- and other genes on impulsive behavioral aggression and cognitive impulsivity in children with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Findings from a family-based association test (FBAT) analysis. *Behavioral and brain functions : BBF* **4**: 48.
- Oikonomakis V, Kosma K, Mitrakos A, Sofocleous C, Pervanidou P, Syrmou A, Pampanos A, Psoni S, Fryssira H, Kanavakis E et al. 2016. Recurrent copy number variations as risk factors for Autism Spectrum Disorders: analysis of the clinical implications. *Clin Genet*.
- Oksenberg N, Ahituv N. 2013. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends Genet* **29**(10): 600-608.
- Oladnabi M, Musante L, Larti F, Hu H, Abedini SS, Wienker T, Ropers HH, Kahrizi K, Najmabadi H. 2015. New evidence for the role of calpain 10 in autosomal recessive intellectual disability: identification of two novel nonsense variants by exome sequencing in Iranian families. *Archives of Iranian medicine* **18**(3): 179-184.
- Ortiz AE, Gasso P, Mas S, Falcon C, Bargallo N, Lafuente A, Lazaro L. 2015. Association between genetic variants of serotonergic and glutamatergic pathways and the concentration of neurometabolites of the anterior cingulate cortex in paediatric patients with obsessive-compulsive disorder. *World J Biol Psychiatry*: 1-11.
- Ou Z, Berg JS, Yonath H, Enciso VB, Miller DT, Picker J, Lenzi T, Keegan CE, Sutton VR, Belmont J et al. 2008. Microduplications of 22q11.2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes. *Genet Med* **10**(4): 267-277.
- Ozonoff S, Young GS, Carter A, Messinger D, Yirmiya N, Zwaigenbaum L, Bryson S, Carver LJ, Constantino JN, Dobkins K et al. 2011. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics* **128**(3): e488-495.
- Paciorkowski AR, Keppler-Noreuil K, Robinson L, Sullivan C, Sajan S, Christian SL, Bukshpun P, Gabriel SB, Gleeson JG, Sherr EH et al. 2013. Deletion 16p13.11 uncovers NDE1 mutations on the non-deleted homolog and extends the spectrum of severe microcephaly to include fetal brain disruption. *Am J Med Genet A* **161A**(7): 1523-1530.
- Palmer E, Speirs H, Taylor PJ, Mullan G, Turner G, Einfeld S, Tonge B, Mowat D. 2013. Changing interpretation of chromosomal microarray over time in a community cohort with intellectual disability. *Am J Med Genet A*.
- Palomares M, Delicado A, Mansilla E, de Torres ML, Vallespin E, Fernandez L, Martinez-Glez V, Garcia-Minaur S, Nevado J, Simarro FS et al. 2011. Characterization of a 8q21.1 microdeletion syndrome associated with intellectual disability and a recognizable phenotype. *Am J Hum Genet* **89**(2): 295-301.

- Pang AW, MacDonald JR, Pinto D, Wei J, Rafiq MA, Conrad DF, Park H, Hurles ME, Lee C, Venter JC et al. 2010. Towards a comprehensive structural variation map of an individual human genome. *Genome Biol* **11**(5): R52.
- Patel DR, Greydanus DE, Calles JL, Jr., Pratt HD. 2010. Developmental disabilities across the lifespan. *Disease-a-month : DM* **56**(6): 304-397.
- Pebrel-Richard C, Kemeny S, Gouas L, Eymard-Pierre E, Blanc N, Francannet C, Tchirkov A, Goumy C, Vago P. 2012. An atypical 0.8 Mb inherited duplication of 22q11.2 associated with psychomotor impairment. *Eur J Med Genet* **55**(11): 650-655.
- Perez-Gay L, Gomez-Lado C, Eiris-Punal J, Dacruz D, Quintela I, Barros-Angueira F, Castro-Gago M. 2013. [Microdeletion 2q23.1 and syndromic findings]. *Revista de neurologia* **57**(9): 430-431.
- Persico AM, Napolioni V. 2013. Autism genetics. *Behavioural brain research* **251**: 95-112.
- Pham J, Shaw C, Pursley A, Hixson P, Sampath S, Roney E, Gambin T, Kang SH, Bi W, Lalani S et al. 2014. Somatic mosaicism detected by exon-targeted, high-resolution aCGH in 10 362 consecutive cases. *Eur J Hum Genet*.
- Philippe A, Malan V, Jacquemont ML, Boddaert N, Bonnefont JP, Odent S, Munnich A, Colleaux L, Cormier-Daire V. 2013. Xq25 duplications encompassing GRIA3 and STAG2 genes in two families convey recognizable X-linked intellectual disability with distinctive facial appearance. *Am J Med Genet A* **161A**(6): 1370-1375.
- Philips AK, Siren A, Avela K, Somer M, Peippo M, Ahvenainen M, Doagu F, Arvio M, Kaariainen H, Van Esch H et al. 2014. X-exome sequencing in Finnish families with intellectual disability--four novel mutations and two novel syndromic phenotypes. *Orphanet J Rare Dis* **9**: 49.
- Piard J, Philippe C, Marvier M, Beneteau C, Roth V, Valduga M, Beri M, Bonnet C, Gregoire MJ, Jonveaux P et al. 2010. Clinical and molecular characterization of a large family with an interstitial 15q11q13 duplication. *Am J Med Genet A* **152A**(8): 1933-1941.
- Pinto D, Delaby E, Merico D, Barbosa M, Merikangas A, Klei L, Thiruvahindrapuram B, Xu X, Ziman R, Wang Z et al. 2014. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* **94**(5): 677-694.
- Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS et al. 2010. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature* **466**(7304): 368-372.
- Pirooznia M, Goes FS, Zandi PP. 2015. Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches. *Front Genet* **6**: 138.
- Piton A, Redin C, Mandel JL. 2013. XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing. *Am J Hum Genet* **93**(2): 368-383.
- Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, Eisen MB, Pergamenschikov A, Williams CF, Jeffrey SS, Botstein D, Brown PO. 1999. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* **23**(1): 41-46.
- Popp B, Stove SI, Ende S, Myklebust LM, Hoyer J, Sticht H, Azzarello-Burri S, Rauch A, Arnesen T, Reis A. 2015. De novo missense mutations in the NAA10 gene cause severe non-syndromic developmental delay in males and females. *Eur J Hum Genet* **23**(5): 602-609.
- Portnoi MF. 2009. Microduplication 22q11.2: a new chromosomal syndrome. *Eur J Med Genet* **52**(2-3): 88-93.
- Portnoi MF, Lebas F, Gruchy N, Ardalan A, Biran-Mucignat V, Malan V, Finkel L, Roger G, Ducrocq S, Gold F et al. 2005. 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some

- overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A* **137**(1): 47-51.
- Potocki L, Bi W, Treadwell-Deering D, Carvalho CM, Eifert A, Friedman EM, Glaze D, Krull K, Lee JA, Lewis RA et al. 2007. Characterization of Potocki-Lupski syndrome (dup(17)(p11.2p11.2)) and delineation of a dosage-sensitive critical interval that can convey an autism phenotype. *Am J Hum Genet* **80**(4): 633-649.
- Poulsen EG, Steinhauer C, Lees M, Lauridsen AM, Ellgaard L, Hartmann-Petersen R. 2012. HUWE1 and TRIP12 collaborate in degradation of ubiquitin-fusion proteins and misframed ubiquitin. *PLoS One* **7**(11): e50548.
- Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, Kou Y, Harony-Nicolas H, Kajiwara Y, De Rubeis S, Durand S, Stevens C, Rehnstrom K et al. 2013. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **93**(4): 607-619.
- Prasad A, Merico D, Thiruvahindrapuram B, Wei J, Lionel AC, Sato D, Rickaby J, Lu C, Szatmari P, Roberts W et al. 2012. A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. *G3 (Bethesda)* **2**(12): 1665-1685.
- Quintela I, Barros-Angueira F, Perez-Gay L, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris-Punal J. 2015a. [Deletion of the RPS6KA3 gene in a female with a classical phenotype of Coffin-Lowry syndrome including stimulus-induced drop attacks]. *Revista de neurologia* **61**(2): 94-96.
- Quintela I, Barros-Angueira F, Perez-Gay L, Dacruz D, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris-Punal J. 2015b. [Molecular characterisation and phenotypic description of two patients with reciprocal chromosomal aberrations in the region of the 3q29 microdeletion/microduplication syndromes]. *Revista de neurologia* **61**(6): 255-260.
- Quintela I, Barros F, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris J. 2015c. Clinical characterization of a male patient with the recently described 8q21.11 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* **167**(6): 1369-1373.
- Quintela I, Barros F, Fernandez-Prieto M, Martinez-Regueiro R, Castro-Gago M, Carracedo A, Gomez-Lado C, Eiris J. 2015d. Interstitial microdeletions including the chromosome band 4q13.2 and the UBA6 gene as possible causes of intellectual disability and behavior disorder. *Am J Med Genet A* **167**(12): 3113-3120.
- Quintela I, Barros F, Lago-Leston R, Castro-Gago M, Carracedo A, Eiris J. 2015e. A maternally inherited 16p13.11-p12.3 duplication concomitant with a de novo SOX5 deletion in a male patient with global developmental delay, disruptive and obsessive behaviors and minor dysmorphic features. *Am J Med Genet A* **167**(6): 1315-1322.
- Quintela I, Fernandez-Prieto M, Gomez-Guerrero L, Resches M, Eiris J, Barros F, Carracedo A. 2015f. A 6q14.1-q15 microdeletion in a male patient with severe autistic disorder, lack of oral language, and dysmorphic features with concomitant presence of a maternally inherited Xp22.31 copy number gain. *Clinical case reports* **3**(6): 415-423.
- Quintela I, Gomez-Guerrero L, Fernandez-Prieto M, Resches M, Barros F, Carracedo A. 2015g. Female patient with autistic disorder, intellectual disability, and co-morbid anxiety disorder: Expanding the phenotype associated with the recurrent 3q13.2-q13.31 microdeletion. *Am J Med Genet A* **167**(12): 3121-3129.
- Ramalingam A, Zhou XG, Fiedler SD, Brawner SJ, Joyce JM, Liu HY, Yu S. 2011. 16p13.11 duplication is a risk factor for a wide spectrum of neuropsychiatric disorders. *J Hum Genet* **56**(7): 541-544.
- Rasmussen MB, Nielsen JV, Lourenco CM, Melo JB, Halgren C, Geraldi CV, Marques W, Jr., Rodrigues GR, Thomassen M, Bak M et al. 2014. Neurodevelopmental disorders associated

- with dosage imbalance of ZBTB20 correlate with the morbidity spectrum of ZBTB20 candidate target genes. *J Med Genet*.
- Rauch A, Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zenker M, Huffmeier U, Thiel C, Ruschendorf F et al. 2006. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet A* **140**(19): 2063-2074.
- Rauch A, Wieczorek D, Graf E, Wieland T, Ende S, Schwarzmayr T, Albrecht B, Bartholdi D, Beygo J, Di Donato N et al. 2012. Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study. *Lancet* **380**(9854): 1674-1682.
- Rauch A, Zink S, Zweier C, Thiel CT, Koch A, Rauch R, Lascorz J, Huffmeier U, Weyand M, Singer H et al. 2005. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11.2. *J Med Genet* **42**(11): 871-876.
- Redin C, Gerard B, Lauer J, Herenger Y, Muller J, Quartier A, Masurel-Paulet A, Willems M, Lesca G, El-Chehadeh S et al. 2014. Efficient strategy for the molecular diagnosis of intellectual disability using targeted high-throughput sequencing. *J Med Genet* **51**(11): 724-736.
- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W et al. 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**(7118): 444-454.
- Roberts JL, Hovanes K, Dasouki M, Manzardo AM, Butler MG. 2014. Chromosomal microarray analysis of consecutive individuals with autism spectrum disorders or learning disability presenting for genetic services. *Gene* **535**(1): 70-78.
- Rodgers K, McVey M. 2015. Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Journal of cellular physiology*.
- Rodriguez-Revenga L, Vallespin E, Madrigal I, Palomares M, Mur A, Garcia-Minaur S, Santos F, Mori MA, Lapunzina P, Mila M et al. 2013. A parallel study of different array-CGH platforms in a set of Spanish patients with developmental delay and intellectual disability. *Gene* **521**(1): 82-86.
- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreels F. 1997. The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol* **39**(2): 125-132.
- Rojnueangnit K, Jones JR, Basehore MJ, Robin NH. 2013. Classic phenotype of Coffin-lowry syndrome in a female with stimulus-induced drop episodes and a genotype with preserved N-terminal kinase domain. *Am J Med Genet A*.
- Ronald A, Hoekstra RA. 2011. Autism spectrum disorders and autistic traits: a decade of new twin studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **156B**(3): 255-274.
- Rooryck C, Stef M, Burgelin I, Simon D, Souakri N, Thambo JB, Chateil JF, Lacombe D, Arveiler B. 2009. 2.3 Mb terminal deletion in 12p13.33 associated with oculoauriculovertebral spectrum and evaluation of WNT5B as a candidate gene. *Eur J Med Genet* **52**(6): 446-449.
- Ropers HH. 2008. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* **18**(3): 241-250.
- . 2010. Genetics of early onset cognitive impairment. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **11**: 161-187.
- Rosenfeld JA, Coe BP, Eichler EE, Cuckle H, Shaffer LG. 2012. Estimates of penetrance for recurrent pathogenic copy-number variations. *Genet Med*.
- Rosenfeld JA, Coppinger J, Bejjani BA, Girirajan S, Eichler EE, Shaffer LG, Ballif BC. 2010. Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with

- developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* **2**(1): 26-38.
- Saccone S, De Sario A, Della Valle G, Bernardi G. 1992. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4913-4917.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL et al. 2001. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* **409**(6822): 928-933.
- Sagoo GS, Butterworth AS, Sanderson S, Shaw-Smith C, Higgins JP, Burton H. 2009. 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* **11**(3): 139-146.
- Saito T, Guan F, Papolos DF, Rajouria N, Fann CS, Lachman HM. 2001. Polymorphism in SNAP29 gene promoter region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **6**(2): 193-201.
- Sanders SJ, Ercan-Sencicek AG, Hus V, Luo R, Murtha MT, Moreno-De-Luca D, Chu SH, Moreau MP, Gupta AR, Thomson SA et al. 2011. Multiple recurrent de novo CNVs, including duplications of the 7q11.23 Williams syndrome region, are strongly associated with autism. *Neuron* **70**(5): 863-885.
- Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S et al. 2015. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* **87**(6): 1215-1233.
- Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, DiLullo NM, Parikshak NN, Stein JL et al. 2012. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* **485**(7397): 237-241.
- Sandhu HK, Hollenbeck N, Wassink TH, Philibert RA. 2004. An association study of PCQAP polymorphisms and schizophrenia. *Psychiatric genetics* **14**(3): 169-172.
- Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Larsson H, Hultman CM, Reichenberg A. 2014. The familial risk of autism. *JAMA* **311**(17): 1770-1777.
- Santa Maria L, Faundes V, Curotto B, Morales P, Morales K, Aliaga S, Pugin A, Alliende MA. 2015. Comparison of two subtelomeric assays for the screening of chromosomal rearrangements: analysis of 383 patients, literature review and further recommendations. *J Appl Genet*.
- Saxena V, Ramdas S, Ochoa CR, Wallace D, Bhide P, Kohane I. 2012. Structural, genetic, and functional signatures of disordered neuro-immunological development in autism spectrum disorder. *PLoS One* **7**(12): e48835.
- Schaaf CP. 2014. Nicotinic acetylcholine receptors in human genetic disease. *Genet Med* **16**(9): 649-656.
- Schaaf CP, Boone PM, Sampath S, Williams C, Bader PI, Mueller JM, Shchelochkov OA, Brown CW, Crawford HP, Phalen JA et al. 2012. Phenotypic spectrum and genotype-phenotype correlations of NRXN1 exon deletions. *Eur J Hum Genet* **20**(12): 1240-1247.
- Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. 2011. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **12**: 25-51.
- Schaefer GB, Mendelsohn NJ, Professional P, Guidelines C. 2013. Clinical genetics evaluation in identifying the etiology of autism spectrum disorders: 2013 guideline revisions. *Genet Med* **15**(5): 399-407.

- Schanze I, Schanze D, Bacino CA, Douzgou S, Kerr B, Zenker M. 2013. Haploinsufficiency of SOX5, a member of the SOX (SRY-related HMG-box) family of transcription factors is a cause of intellectual disability. *Eur J Med Genet* **56**(2): 108-113.
- Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurles ME, Feuk L. 2007. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* **39**(7 Suppl): S7-15.
- Schneider A, Puechberty J, Ng BL, Coubes C, Gatinois V, Tournaire M, Girard M, Dumont B, Bouret P, Magnosto J et al. 2015. Identification of disrupted AUTS2 and EPHA6 genes by array painting in a patient carrying a de novo balanced translocation t(3;7) with intellectual disability and neurodevelopment disorder. *Am J Med Genet A*.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* **30**(12): e57.
- Schuurs-Hoeijmakers JH, Vulto-van Silfhout AT, Vissers LE, van de V, II, van Bon BW, de Ligt J, Gilissen C, Hehir-Kwa JY, Neveling K, del Rosario M et al. 2013. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet* **50**(12): 802-811.
- Sebag JA, Zhang C, Hinkle PM, Bradshaw AM, Cone RD. 2013. Developmental control of the melanocortin-4 receptor by MRAP2 proteins in zebrafish. *Science* **341**(6143): 278-281.
- Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J et al. 2007. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* **316**(5823): 445-449.
- Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M et al. 2004. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**(5683): 525-528.
- Seidman JG, Seidman C. 2002. Transcription factor haploinsufficiency: when half a loaf is not enough. *J Clin Invest* **109**(4): 451-455.
- Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, Kirkpatrick S, Coppinger J, Ballif BC. 2007. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **145C**(4): 335-345.
- Shaffer LG, Kashork CD, Saleki R, Rorem E, Sundin K, Ballif BC, Bejjani BA. 2006. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. *J Pediatr* **149**(1): 98-102.
- Shashi V, Xie P, Schoch K, Goldstein DB, Howard TD, Berry MN, Schwartz CE, Cronin K, Sliwa S, Allen A et al. 2014. The RBMX gene as a candidate for the Shashi X-linked intellectual disability syndrome. *Clin Genet*.
- Shaw-Smith C, Redon R, Rickman L, Rio M, Willatt L, Fiegler H, Firth H, Sanlaville D, Winter R, Colleaux L et al. 2004. 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* **41**(4): 241-248.
- Shaw CJ, Lupski JR. 2005. Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. *Hum Genet* **116**(1-2): 1-7.
- Shen Y, Dies KA, Holm IA, Bridgemohan C, Sobeih MM, Caronna EB, Miller KJ, Frazier JA, Silverstein I, Picker J et al. 2010. Clinical genetic testing for patients with autism spectrum disorders. *Pediatrics* **125**(4): e727-735.

- Shi L, Zhang X, Golhar R, Otieno FG, He M, Hou C, Kim C, Keating B, Lyon GJ, Wang K et al. 2013. Whole-genome sequencing in an autism multiplex family. *Molecular autism* **4**(1): 8.
- Shimada S, Okamoto N, Nomura S, Fukui M, Shimakawa S, Sangu N, Shimojima K, Osawa M, Yamamoto T. 2013. Microdeletions of 5.5 Mb (4q13.2-q13.3) and 4.1 Mb (7p15.3-p21.1) associated with a saethre-chotzen-like phenotype, severe intellectual disability, and autism. *Am J Med Genet A* **161A**(8): 2078-2083.
- Shimojima K, Imai K, Yamamoto T. 2010. A de novo 22q11.22q11.23 interchromosomal tandem duplication in a boy with developmental delay, hyperactivity, and epilepsy. *Am J Med Genet A* **152A**(11): 2820-2826.
- Shimojima K, Okamoto N, Inazu T, Yamamoto T. 2011. Tandem configurations of variably duplicated segments of 22q11.2 confirmed by fiber-FISH analysis. *J Hum Genet* **56**(11): 810-812.
- Shimojima K, Saito K, Yamamoto T. 2009. A de novo 1.9-Mb interstitial deletion of 3q13.2q13.31 in a girl with dysmorphic features, muscle hypotonia, and developmental delay. *Am J Med Genet A* **149A**(8): 1818-1822.
- Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A et al. 2010. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* **47**(5): 332-341.
- Shoukier M, Klein N, Auber B, Wickert J, Schroder J, Zoll B, Burfeind P, Bartels I, Alsat EA, Lingen M et al. 2013. Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? *Clin Genet* **83**(1): 53-65.
- Shuvarikov A, Campbell IM, Dittwald P, Neill NJ, Bialer MG, Moore C, Wheeler PG, Wallace SE, Hannibal MC, Murray MF et al. 2013. Recurrent HERV-H-mediated 3q13.2-q13.31 deletions cause a syndrome of hypotonia and motor, language, and cognitive delays. *Hum Mutat* **34**(10): 1415-1423.
- Silverman W. 2009. Prevention of intellectual and developmental disabilities. *Intellectual and developmental disabilities* **47**(4): 320-322.
- Slavotinek AM. 2008. Novel microdeletion syndromes detected by chromosome microarrays. *Hum Genet* **124**(1): 1-17.
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V. 2001. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* **1**(2): 277-290.
- Snijders AM, Nowak N, Seagraves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K et al. 2001. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* **29**(3): 263-264.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Dohner H, Cremer T, Lichter P. 1997. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* **20**(4): 399-407.
- Soysal Y, Vermeesch J, Davani NA, Hekimler K, Imirzalioglu N. 2011. A 10.46 Mb 12p11.1-12.1 interstitial deletion coincident with a 0.19 Mb NRXN1 deletion detected by array CGH in a girl with scoliosis and autism. *Am J Med Genet A* **155A**(7): 1745-1752.
- Speicher MR, Gwyn Ballard S, Ward DC. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* **12**(4): 368-375.

- Spielmann M, Klopocki E. 2013. CNVs of noncoding cis-regulatory elements in human disease. *Curr Opin Genet Dev* **23**(3): 249-256.
- Stankiewicz P, Lupski JR. 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* **18**(2): 74-82.
- . 2010. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* **61**: 437-455.
- Stefansson H, Meyer-Lindenberg A, Steinberg S, Magnusdottir B, Morgen K, Arnarsdottir S, Bjornsdottir G, Walters GB, Jonsdottir GA, Doyle OM et al. 2013. CNVs conferring risk of autism or schizophrenia affect cognition in controls. *Nature* **505**(7483): 361-366.
- Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. 2012. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *International journal of molecular sciences* **13**(3): 3245-3276.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D et al. 2002. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* **80**(2): 129-134.
- Sylwestrak EL, Ghosh A. 2012. Elnf1 regulates target-specific release probability at CA1-interneuron synapses. *Science* **338**(6106): 536-540.
- Szafranski P, Schaaf CP, Person RE, Gibson IB, Xia Z, Mahadevan S, Wiszniewska J, Bacino CA, Lalani S, Potocki L et al. 2010. Structures and molecular mechanisms for common 15q13.3 microduplications involving CHRNA7: benign or pathological? *Hum Mutat* **31**(7): 840-850.
- Tabares-Seisdedos R, Rubenstein JL. 2009. Chromosome 8p as a potential hub for developmental neuropsychiatric disorders: implications for schizophrenia, autism and cancer. *Mol Psychiatry* **14**(6): 563-589.
- Takase K, Ohtsuki T, Migita O, Toru M, Inada T, Yamakawa-Kobayashi K, Arinami T. 2001. Association of ZNF74 gene genotypes with age-at-onset of schizophrenia. *Schizophr Res* **52**(3): 161-165.
- Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA, van Bon BW, Shen Y, Repnikova EA, Gastier-Foster J, Thrush DL, Kathiresan S, Ruderfer DM et al. 2011. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* **89**(4): 551-563.
- Talkowski ME, Rosenfeld JA, Blumenthal I, Pillalamarri V, Chiang C, Heilbut A, Ernst C, Hanscom C, Rossin E, Lindgren AM et al. 2012. Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell* **149**(3): 525-537.
- Tam E, Young EJ, Morris CA, Marshall CR, Loo W, Scherer SW, Mervis CB, Osborne LR. 2008. The common inversion of the Williams-Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *Am J Med Genet A* **146A**(14): 1797-1806.
- Tan R, Wang Y, Kleinstein SE, Liu Y, Zhu X, Guo H, Jiang Q, Allen AS, Zhu M. 2014. An evaluation of copy number variation detection tools from whole-exome sequencing data. *Hum Mutat* **35**(7): 899-907.
- Tan TY, Collins A, James PA, McGillivray G, Stark Z, Gordon CT, Leventer RJ, Pope K, Forbes R, Crolla JA et al. 2011. Phenotypic variability of distal 22q11.2 copy number abnormalities. *Am J Med Genet A* **155A**(7): 1623-1633.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A et al. 2009. A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* **41**(5): 535-543.

- Tassano E, De Santis LR, Corona MF, Parmigiani S, Zanetti D, Porta S, Gimelli G, Cuoco C. 2015. Concomitant deletion of chromosome 16p13.11 and triplication of chromosome 19p13.3 in a child with developmental disorders, intellectual disability, and epilepsy. *Mol Cytogenet* **8**: 9.
- Thevenon J, Callier P, Andrieux J, Delobel B, David A, Sukno S, Minot D, Mosca Anne L, Marle N, Sanlaville D et al. 2013. 12p13.33 microdeletion including ELKS/ERC1, a new locus associated with childhood apraxia of speech. *Eur J Hum Genet* **21**(1): 82-88.
- Thevenon J, Michot C, Bole C, Nitschke P, Nizon M, Faivre L, Munnich A, Lyonnet S, Bonnefont JP, Portes VD et al. 2015. RPL10 mutation segregating in a family with X-linked syndromic Intellectual Disability. *Am J Med Genet A*.
- Thirtamara Rajamani K, O'Neill B, Han DD, Frosthalm A, Rotter A, Gu HH. 2015. Inactivation of the catalytic phosphatase domain of PTPRT/RPTPrho increases social interaction in mice. *Autism Res* **8**(1): 19-28.
- Thomas AC, Williams H, Seto-Salvia N, Bacchelli C, Jenkins D, O'Sullivan M, Mengrelis K, Ishida M, Ocaka L, Chanudet E et al. 2014. Mutations in SNX14 cause a distinctive autosomal-recessive cerebellar ataxia and intellectual disability syndrome. *Am J Hum Genet* **95**(5): 611-621.
- Thorson L, Bryke C, Rice G, Artzer A, Schilz C, Israel J, Huber S, Laffin J, Raca G. 2010. Clinical and molecular characterization of overlapping interstitial Xp21-p22 duplications in two unrelated individuals. *Am J Med Genet A* **152A**(4): 904-915.
- Toma C, Torrico B, Hervas A, Valdes-Mas R, Tristan-Noguero A, Padillo V, Maristany M, Salgado M, Arenas C, Puente XS et al. 2013. Exome sequencing in multiplex autism families suggests a major role for heterozygous truncating mutations. *Mol Psychiatry*.
- Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, Suzuki T, Odagawa M, Odaka YS, Iwayama Y et al. 2014. Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nature communications* **5**: 4501.
- Tonne E, Holdhus R, Stansberg C, Stray-Pedersen A, Petersen K, Brunner HG, Gilissen C, Hoischen A, Prescott T, Steen VM et al. 2015. Syndromic X-linked intellectual disability segregating with a missense variant in RLIM. *Eur J Hum Genet*.
- Topper S, Ober C, Das S. 2011. Exome sequencing and the genetics of intellectual disability. *Clin Genet* **80**(2): 117-126.
- Tran Mau-Them F, Willems M, Albrecht B, Sanchez E, Puechberty J, Ende S, Schneider A, Ruiz Pallares N, Missirian C, Rivier F et al. 2014. Expanding the phenotype of IQSEC2 mutations: truncating mutations in severe intellectual disability. *Eur J Hum Genet* **22**(2): 289-292.
- Tropeano M, Ahn JW, Dobson RJ, Breen G, Rucker J, Dixit A, Pal DK, McGuffin P, Farmer A, White PS et al. 2013. Male-biased autosomal effect of 16p13.11 copy number variation in neurodevelopmental disorders. *PLoS One* **8**(4): e61365.
- Tucker T, Montpetit A, Chai D, Chan S, Chenier S, Coe BP, Delaney A, Eydoux P, Lam WL, Langlois S et al. 2011. Comparison of genome-wide array genomic hybridization platforms for the detection of copy number variants in idiopathic mental retardation. *BMC medical genomics* **4**: 25.
- Turner TN, Hormozdiari F, Duyzend MH, McClymont SA, Hook PW, Iossifov I, Raja A, Baker C, Hoekzema K, Stessman HA et al. 2016. Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA. *Am J Hum Genet* **98**(1): 58-74.
- Ullmann R, Turner G, Kirchhoff M, Chen W, Tonge B, Rosenberg C, Field M, Vianna-Morgante AM, Christie L, Krepischi-Santos AC et al. 2007. Array CGH identifies reciprocal 16p13.1

- duplications and deletions that predispose to autism and/or mental retardation. *Hum Mutat* **28**(7): 674-682.
- Utine GE, Haliloglu G, Volkan-Salanci B, Cetinkaya A, Kiper PO, Alanay Y, Aktas D, Anlar B, Topcu M, Boduroglu K et al. 2014. Etiological yield of SNP microarrays in idiopathic intellectual disability. *Eur J Paediatr Neurol*.
- Vallespin E, Palomares Bralo M, Mori MA, Martin R, Garcia-Minaur S, Fernandez L, de Torres ML, Garcia-Santiago F, Mansilla E, Santos F et al. 2013. Customized high resolution CGH-array for clinical diagnosis reveals additional genomic imbalances in previous well-defined pathological samples. *Am J Med Genet A* **161A**(8): 1950-1960.
- van Bon BW, Koolen DA, Brueton L, McMullan D, Lichtenbelt KD, Ades LC, Peters G, Gibson K, Moloney S, Novara F et al. 2010. The 2q23.1 microdeletion syndrome: clinical and behavioural phenotype. *Eur J Hum Genet* **18**(2): 163-170.
- Van Esch H. 2012. MECP2 Duplication Syndrome. *Mol Syndromol* **2**(3-5): 128-136.
- Vanlerberghe C, Petit F, Malan V, Vincent-Delorme C, Bouquillon S, Boute O, Holder-Espinasse M, Delobel B, Duban B, Vallee L et al. 2015. 15q11.2 microdeletion (BP1-BP2) and developmental delay, behaviour issues, epilepsy and congenital heart disease: a series of 52 patients. *Eur J Med Genet* **58**(3): 140-147.
- Vargas H, Beldia G, Korosh W, Sudhalter V, Iqbal A, Sanchez-Lacay JA, Velinov M. 2012. A 4.5 Mb terminal deletion of chromosome 12p helps further define a psychosis-associated locus. *Eur J Med Genet* **55**(10): 573-576.
- Vassos E, Collier DA, Holden S, Patch C, Rujescu D, St Clair D, Lewis CM. 2010. Penetrance for copy number variants associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* **19**(17): 3477-3481.
- Velinov M, Beldia G, Gu H, Tsiouris JA, Jenkins EC, Brown WT. 2008. Psychotic manifestations in a patient with mental retardation and a 6.2 megabase deletion at the distal short arm of chromosome 12. *CNS Spectr* **13**(6): 515-519.
- Vergult S, Van Binsbergen E, Sante T, Nowak S, Vanakker O, Claes K, Poppe B, Van der Aa N, van Roosmalen MJ, Duran K et al. 2014. Mate pair sequencing for the detection of chromosomal aberrations in patients with intellectual disability and congenital malformations. *Eur J Hum Genet* **22**(5): 652-659.
- Vetro A, Bouman K, Hastings R, McMullan DJ, Vermeesch JR, Miller K, Sikkema-Raddatz B, Ledbetter DH, Zuffardi O, van Ravenswaaij-Arts CM. 2012. The introduction of arrays in prenatal diagnosis: a special challenge. *Hum Mutat* **33**(6): 923-929.
- Vinas-Jornet M, Esteba-Castillo S, Gabau E, Ribas-Vidal N, Baena N, San J, Ruiz A, Coll MD, Novell R, Guitart M. 2014. A common cognitive, psychiatric, and dysmorphic phenotype in carriers of NRXN1 deletion. *Molecular genetics & genomic medicine* **2**(6): 512-521.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Stehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M et al. 2010a. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* **42**(12): 1109-1112.
- Vissers LE, de Vries BB, Osoegawa K, Janssen IM, Feuth T, Choy CO, Straatman H, van der Vliet W, Huys EH, van Rijk A et al. 2003. Array-based comparative genomic hybridization for the genomewide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *Am J Hum Genet* **73**(6): 1261-1270.
- Vissers LE, de Vries BB, Veltman JA. 2010b. Genomic microarrays in mental retardation: from copy number variation to gene, from research to diagnosis. *J Med Genet* **47**(5): 289-297.

- Visser LE, Stankiewicz P. 2012. Microdeletion and microduplication syndromes. *Methods Mol Biol* **838**: 29-75.
- Vorstman JA, Chow EW, Ophoff RA, van Engeland H, Beemer FA, Kahn RS, Sinke RJ, Bassett AS. 2009. Association of the PIK4CA schizophrenia-susceptibility gene in adults with the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **150B**(3): 430-433.
- Vorstman JA, van Daalen E, Jalali GR, Schmidt ER, Pasterkamp RJ, de Jonge M, Hennekam EA, Janson E, Staal WG, van der Zwaag B et al. 2011. A double hit implicates DIAPH3 as an autism risk gene. *Mol Psychiatry* **16**(4): 442-451.
- Vuillaume ML, Delrue MA, Naudion S, Toutain J, Fergelot P, Arveiler B, Lacombe D, Rooryck C. 2013. Expanding the clinical phenotype at the 3q13.31 locus with a new case of microdeletion and first characterization of the reciprocal duplication. *Molecular genetics and metabolism* **110**(1-2): 90-97.
- Vulto-van Silfhout AT, Hehir-Kwa JY, van Bon BW, Schuurs-Hoeijmakers JH, Meader S, Hellebrekers CJ, Thoonen IJ, de Brouwer AP, Brunner HG, Webber C et al. 2013. Clinical Significance of De Novo and Inherited Copy-Number Variation. *Hum Mutat*.
- Vulto-van Silfhout AT, Rajamanickam S, Jensik PJ, Vergult S, de Roker N, Newhall KJ, Raghavan R, Reardon SN, Jarrett K, McIntyre T et al. 2014. Mutations affecting the SAND domain of DEAF1 cause intellectual disability with severe speech impairment and behavioral problems. *Am J Hum Genet* **94**(5): 649-661.
- Wagenstaller J, Spranger S, Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T et al. 2007. Copy-number variations measured by single-nucleotide-polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet* **81**(4): 768-779.
- Walker S, Scherer SW. 2013. Identification of candidate intergenic risk loci in autism spectrum disorder. *BMC Genomics* **14**: 499.
- Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J, Falchi M, Chen F, Andrieux J, Lobbens S et al. 2010. A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* **463**(7281): 671-675.
- Walzl S. 2014. Intellectual disability: novel mutations in DEAF1 cause speech impairment and behavioral problems. *Clin Genet* **86**(6): 507-508.
- Walz K, Young JI. 2014. The methyl binding domain containing protein MBD5 is a transcriptional regulator responsible for 2q23.1 deletion syndrome. *Rare diseases* **2**(1): e967151.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM et al. 2009. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* **459**(7246): 528-533.
- Wang Y, Martinez JE, Wilson GL, He XY, Tuck-Muller CM, Maertens P, Wertelecki W, Chen TJ. 2006. A novel RSK2 (RPS6KA3) gene mutation associated with abnormal brain MRI findings in a family with Coffin-Lowry syndrome. *Am J Med Genet A* **140**(12): 1274-1279.
- Watson CT, Marques-Bonet T, Sharp AJ, Mefford HC. 2014. The genetics of microdeletion and microduplication syndromes: an update. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **15**: 215-244.
- Weedon MN, Hastings R, Caswell R, Xie W, Paszkiewicz K, Antoniadi T, Williams M, King C, Greenhalgh L, Newbury-Ecob R et al. 2011. Exome sequencing identifies a DYNC1H1 mutation in a large pedigree with dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet* **89**(2): 308-312.

- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC, Jr., Hardekopf D, Pekova S, Bhatt S, Kosyakova N, Liehr T. 2012. Microdeletion and microduplication syndromes. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **60**(5): 346-358.
- Weisfeld-Adams JD, Edelmann L, Gadi IK, Mehta L. 2012. Phenotypic heterogeneity in a family with a small atypical microduplication of chromosome 22q11.2 involving TBX1. *Eur J Med Genet* **55**(12): 732-736.
- Weiss LA, Arking DE, Gene Discovery Project of Johns H, the Autism C, Daly MJ, Chakravarti A. 2009. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* **461**(7265): 802-808.
- Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T et al. 2008. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* **358**(7): 667-675.
- Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, Boucher CA, Shepherd L, Willatt L, Parkin G et al. 2010. Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *Am J Hum Genet* **87**(2): 173-188.
- Willatt L, Cox J, Barber J, Cabanas ED, Collins A, Donnai D, FitzPatrick DR, Maher E, Martin H, Parnau J et al. 2005. 3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome. *Am J Hum Genet* **77**(1): 154-160.
- Willemsen M, Kleefstra T. 2013. Making headway with genetic diagnostics of intellectual disabilities. *Clin Genet*.
- Willemsen MH, de Leeuw N, de Brouwer AP, Pfundt R, Hehir-Kwa JY, Yntema HG, Nillesen WM, de Vries BB, van Bokhoven H, Kleefstra T. 2012a. Interpretation of clinical relevance of X-chromosome copy number variations identified in a large cohort of individuals with cognitive disorders and/or congenital anomalies. *Eur J Med Genet* **55**(11): 586-598.
- Willemsen MH, Vissers LE, Willemsen MA, van Bon BW, Kroes T, de Ligt J, de Vries BB, Schoots J, Lugtenberg D, Hamel BC et al. 2012b. Mutations in DYNC1H1 cause severe intellectual disability with neuronal migration defects. *J Med Genet* **49**(3): 179-183.
- Williams NM, Zaharieva I, Martin A, Langley K, Mantripragada K, Fossdal R, Stefansson H, Stefansson K, Magnusson P, Gudmundsson OO et al. 2010a. Rare chromosomal deletions and duplications in attention-deficit hyperactivity disorder: a genome-wide analysis. *Lancet* **376**(9750): 1401-1408.
- Williams SR, Mullegama SV, Rosenfeld JA, Dagli AI, Hatchwell E, Allen WP, Williams CA, Elsea SH. 2010b. Haploinsufficiency of MBD5 associated with a syndrome involving microcephaly, intellectual disabilities, severe speech impairment, and seizures. *Eur J Hum Genet* **18**(4): 436-441.
- Wincent J, Anderlid BM, Lagerberg M, Nordenskjold M, Schoumans J. 2011. High-resolution molecular karyotyping in patients with developmental delay and/or multiple congenital anomalies in a clinical setting. *Clin Genet* **79**(2): 147-157.
- Wisniowiecka-Kowalnik B, Kastory-Bronowska M, Bartnik M, Derwinska K, Dymczak-Domini W, Szumbaraska D, Ziemka E, Szczaluba K, Sykulski M, Gambin T et al. 2013. Application of custom-designed oligonucleotide array CGH in 145 patients with autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **21**(6): 620-625.
- Wisniowiecka-Kowalnik B, Nesteruk M, Peters SU, Xia Z, Cooper ML, Savage S, Amato RS, Bader P, Browning MF, Haun CL et al. 2010. Intragenic rearrangements in NRXN1 in three families

- with autism spectrum disorder, developmental delay, and speech delay. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **153B**(5): 983-993.
- Won H, Mah W, Kim E. 2013. Autism spectrum disorder causes, mechanisms, and treatments: focus on neuronal synapses. *Frontiers in molecular neuroscience* **6**: 19.
- Wonodi I, Hong LE, Avila MT, Buchanan RW, Carpenter WT, Jr., Stine OC, Mitchell BD, Thaker GK. 2005. Association between polymorphism of the SNAP29 gene promoter region and schizophrenia. *Schizophr Res* **78**(2-3): 339-341.
- Wright CF, Fitzgerald TW, Jones WD, Clayton S, McRae JF, van Kogelenberg M, King DA, Ambridge K, Barrett DM, Bayzatinova T et al. 2015. Genetic diagnosis of developmental disorders in the DDD study: a scalable analysis of genome-wide research data. *Lancet* **385**(9975): 1305-1314.
- Wu Q, DiBona VL, Bernard LP, Zhang H. 2012. The polarity protein partitioning-defective 1 (PAR-1) regulates dendritic spine morphogenesis through phosphorylating postsynaptic density protein 95 (PSD-95). *J Biol Chem* **287**(36): 30781-30788.
- Wu Y, Arai AC, Rumbaugh G, Srivastava AK, Turner G, Hayashi T, Suzuki E, Jiang Y, Zhang L, Rodriguez J et al. 2007. Mutations in ionotropic AMPA receptor 3 alter channel properties and are associated with moderate cognitive impairment in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18163-18168.
- Xiang B, Zhu H, Shen Y, Miller DT, Lu K, Hu X, Andersson HC, Narumanchi TM, Wang Y, Martinez JE et al. 2010. Genome-wide oligonucleotide array comparative genomic hybridization for etiological diagnosis of mental retardation: a multicenter experience of 1499 clinical cases. *J Mol Diagn* **12**(2): 204-212.
- Xing GQ, Russell S, Webster MJ, Post RM. 2004. Decreased expression of mineralocorticoid receptor mRNA in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum* **7**(2): 143-153.
- Xu J, Zwaigenbaum L, Szatmari P, Scherer S. 2004. Molecular cytogenetics of autism. *Curr Genomics* **5**: 347-364.
- Xu X, Zhang L, Tong P, Xun G, Su W, Xiong Z, Zhu T, Zheng Y, Luo S, Pan Y et al. 2013. Exome sequencing identifies UPF3B as the causative gene for a Chinese non-syndrome mental retardation pedigree. *Clin Genet* **83**(6): 560-564.
- Youssofian H, Pyeritz RE. 2002. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* **3**(10): 748-758.
- Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, Schmitz-Abe K, Harmin DA, Adli M, Malik AN et al. 2013. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* **77**(2): 259-273.
- Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y et al. 2015. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nature medicine* **21**(2): 185-191.
- Zahir F, Friedman JM. 2007. The impact of array genomic hybridization on mental retardation research: a review of current technologies and their clinical utility. *Clin Genet* **72**(4): 271-287.
- Zahir FR, Marra MA. 2015. Use of affymetrix arrays in the diagnosis of gene copy-number variation. *Curr Protoc Hum Genet* **85**: 8.13.11-18.13.13.
- Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. 2015. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* **16**(3): 172-183.

- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrie A, Billuart P, McDonell N, Couvert P, Francis F, Chafey P et al. 2000. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* **24**(2): 167-170.
- Zeniou M, Pannetier S, Fryns JP, Hanauer A. 2002. Unusual splice-site mutations in the RSK2 gene and suggestion of genetic heterogeneity in Coffin-Lowry syndrome. *Am J Hum Genet* **70**(6): 1421-1433.
- Zhang F, Carvalho CM, Lupski JR. 2009a. Complex human chromosomal and genomic rearrangements. *Trends Genet* **25**(7): 298-307.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. 2009b. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **10**: 451-481.
- Zhang J, Feuk L, Duggan GE, Khaja R, Scherer SW. 2006. Development of bioinformatics resources for display and analysis of copy number and other structural variants in the human genome. *Cytogenet Genome Res* **115**(3-4): 205-214.
- Zhang Y, Yu X, Ichikawa M, Lyons JJ, Datta S, Lamborn IT, Jing H, Kim ES, Biancalana M, Wolfe LA et al. 2014. Autosomal recessive phosphoglucomutase 3 (PGM3) mutations link glycosylation defects to atopy, immune deficiency, autoimmunity, and neurocognitive impairment. *The Journal of allergy and clinical immunology* **133**(5): 1400-1409 e1405.
- Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. 2013. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives. *BMC Bioinformatics* **14 Suppl 11**: S1.
- Zufferey F, Sherr EH, Beckmann ND, Hanson E, Maillard AM, Hippolyte L, Mace A, Ferrari C, Kutalik Z, Andrieux J et al. 2012. A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* **49**(10): 660-668.

