

**"GRIGORE T. POPA"**  
**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY**  
**IAȘI**

**HABILITATION THESIS**

**FROM CLINIC GENETICS AND  
CYTOGENETICS TO MODERN METHODS  
IN MEDICAL GENETICS**

**PROF. DR. EUSEBIU VLAD GORDUZA**

**IAȘI**  
**2022**

## ABSTRACT

This work is structured in 5 chapters: 4 present the main areas of scientific interest and the last contains the future directions for my activity.

In first chapter I present some data that represent the background of my research activity in the field of chromosomal abnormalities and diseases. In the beginning of 1<sup>st</sup> chapter I present some works about chromosomal syndromes: Down, Patau, Triplo X and Edwards. The epidemiologic, clinic and cytogenetic study on Down syndrome represented a premier for Romanian medical literature and showed a good concordance between clinical genetic examination and results of chromosomal analyse, a high prevalence of major congenital anomalies, being the first Romanian study that calculated the incidence of Down's syndrome - 1.3‰ (1/739) in newborns in Iași County. In Patau's syndrome study we have a significant cohort of 14 cases and we concluded that Patau syndrome is a severe polymorphic chromosomal disease, but in our cohort specific clinical triad was not very frequent. The most severe element was holoprosencephaly spectrum, which it associated with increased in utero and perinatal mortality. The retrospective study of X trisomy emphasizes the difficulty of establishing a genotype - phenotype correlations, with prepubertal diagnosis based on growth retardation, uncharacteristic facial dysmorphism and mild mental retardation, while main postpubertal aspects were ovarian dysgenesis and mild mental retardation. Another study concerning a rare chromosomal disorder concerned Edwards syndrome, when are presented 19 cases with trisomy 18. The clinical features were variable, but the most suggestive were: IUGR, typical craniofacial dysmorphism, heart defects, prominent calcaneus, overriding fingers and preterm birth. Early prenatal diagnosis of trisomy 18 is important for appropriate management decisions regarding neonatal care and invasive procedures. Also, another study about chromosomal disorders made a synthesis of cases confirmed in our laboratory during two calendaristic years (2015-2016). Our study showed the importance of use of different chromosomal analysis for confirmation of etiology of congenital anomalies. In 44.71% cases we discovered a chromosomal abnormality using a sequential strategy of genetic testing, first option remaining karyotype. In cases of a microdeletion, confirmation was apported by FISH or MLPA test. Finally, array-CGH confirmed small genomic imbalances, but its use is not routinely.

In second part of 1<sup>st</sup> chapter I present three studies about specific chromosomal anomalies. First is presented a collaborative study concerning ring chromosome (a very rare disorders). All our 6 cases have *de novo* ring chromosomes, presenting a different phenotype according to the loss of genetic material and genetic instability. The karyotype represents the main analysis for detection of ring chromosomes, but other molecular techniques are necessary for complete characterization. The second anomaly is also a rare chromosomal unbalanced abnormality: inverted duplication deletion of 8p chromosome, where the diagnosis was confirmed by array-CGH. In the end of this chapter we present also a report case, concerning a pseudodicentric 14;18 chromosome with two additional CNVs (attested by array-CGH).

The 2<sup>nd</sup> chapter was reserved for multifactorial disorders. The study on etiology of cardiac malformations showed a high frequency of chromosomal abnormalities among cases with cardiac malformation and mental retardation and proved the benefits of cytogenetic testing in plurimalformative syndromes with congenital heart disease. When "standard" chromosome analysis shows a normal karyotype, molecular cytogenetic techniques are useful to detect submicroscopic chromosomal abnormalities. In a study concerning patients with intellectual disability (ID) we applied MLPA test to detect subtelomeric abnormalities. We found 7.5% cases with such anomalies, higher than the average value reported in the literature, which illustrates the efficiency of using two subtelomeric screening kits. The follow-up kit allows confirmation of the abnormality and estimation of its size, which established the clinical

significance of subtelomeric anomalies. The combined use of karyotype and MLPA kits for the screening of the most frequent submicroscopic anomalies represents an efficient strategy for establishing the etiologic diagnosis in ID patients, particularly when microarrays are unavailable as a first line approach. Another study concerning a multifactorial disorder was about hearing loss. We found 217 patients with pathogenic/likely pathogenic variants, 141 being confirmed by MLPA. We identified two new variants in *GBJ2* gene: c.109G>A and c.100A>T, but the most common variants were c.35delG, c.101T>C, c.313\_326del14 and c.71G>A. All of the patients had been confirmed with Sanger Sequencing, proving that MLPA can be a cost-effective diagnosis method, useful for every patient with hearing impairment.

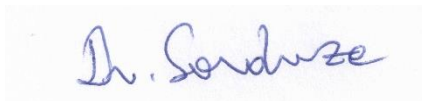
In the 3<sup>th</sup> chapter we presented results of study in reproductive medicine. First I present studies that showed the importance of cytogenetic analysis for couples with reproductive disorders (RD). The results of a retrospective study on 266 couples with RD are consistent with the literature, emphasizing the importance of chromosomal analysis for etiologic diagnosis, management and genetic counseling for such couples. Another retrospective study concerning amenorrhea confirmed that sex chromosome abnormalities represent a major etiologic factor in this disorder. The majority of patients presented ovarian dysgenesis and hypergonadotropic hypogonadism. In this context, we emphasize the importance of cytogenetic investigations, especially the karyotype, for confirmation of diagnosis in all patients with amenorrhea.

Second part of 3<sup>th</sup> chapter was reserved to prenatal medicine. The most important study regarded noninvasive prenatal diagnostic method based on the comparison of the methylation status of maternal versus foetal DNA, a possible alternative to current invasive prenatal diagnostic methods. Our results indicated a good sensibility and specificity, but the number of cases (only 10) was not enough for pertinent conclusions. Other studies concerned application of conventional FISH method in prenatal diagnosis. The first such study attested the usefulness of FISH technique in prenatal diagnosis with 16.30% of cases identified by this method. The prenatal diagnosis by FISH technique ensures rapid results, allowing the choice of reproductive options in pathological cases. Other study using FISH technique highlights the limits of this in prenatal diagnosis of gonosomal anomalies, with main limitations related to impossibility of correct quantifying of mosaic gonosomal anomalies. A multicenter study was focused on polyploidy, being discussed 39 cases. Early diagnosis of polyploid pregnancies would provide an opportunity to early termination of an affected pregnancy. Chromosomal analyze continues to be the gold-standard in the detection of polyploidies, but molecular approaches may provide additional valuable information for the management of the case. In the final of chapter we analyzed the management of increased nuchal translucency, and indicated the need of a good ultrasound examination at 20 to 24 weeks to evaluate the prognostic of such pregnancies.

The 4<sup>th</sup> chapter presents data concerning six rare diseases, a sort of disorders important for medical genetics. The study of cases with velo-cardio-facial syndrome revealed 6 patients with 22q11.2 microdeletion, but these patients are only the "tip of the iceberg". The clinical spectrum of DiGeorge syndrome is highly variable and diagnosis requests application of molecular cytogenetic techniques in selected cases with evocative phenotype, using sensitive clinical score. The case with Limb Body Wall Complex detected prenatally and investigated by pathologic examination confirmed the importance of collaboration between obstetricians, geneticists and pathologists in elucidation of some anomalies of prenatal development. Pallister-Killian syndrome is a rare syndrome and our cohort of five cases represents an important number that allowed us to identify some particular features (marked excess of hair on the forehead and ears, a particular eye disorder, repeated episodes of infection and autonomic dysfunction, complex sensory impairments, and mild early myoclonic jerks). The use of MLPA and array CGH are reliable methods of diagnosis and could be applied as the first intention diagnostic tests. Gorham-Stout disease is a multifactorial disorder with massive osteolysis that have a poor prognosis. The bad prognosis factors are osteolytic lesions of the

spine and pleura. Holt-Oram syndrome is a pleiotropic disorder, in which the main anatomic regions implicated are the heart and the upper limbs. Because of variable expressivity the diagnosis is sometimes delayed. An early diagnosis is necessary for preventing complications in patients and for identifying other family members at risk. Osteogenesis imperfecta is a rare condition characterized by an important genetic heterogeneity. In these conditions, screen for mutations of genes involved in OI pathogenesis imposes whole exome sequencing as the first intention technique. Computational analysis of the pathogenic variant with dedicated programs is absolutely necessary to establish the classification of the mutant variant, especially in prenatal genetic counselling.

The future directions of professional development will imply mainly the prenatal diagnosis, malformative pathology, reproductive disorders, different fields of genomics, oncogenetics and rare disease researches, in some fields being already applied programmes of research.

A handwritten signature in blue ink that reads "Dr. Sorduze". The signature is written in a cursive style and is located on a light-colored rectangular background.

## REZUMAT

Această lucrare este structurată în 5 capitole: 4 prezintă principalele domenii științifice de interes, iar ultimul conține posibile direcții de dezvoltare a activității mele.

În primul capitol prezint principalele mele realizări în domeniul anomaliilor și bolilor cromosomice. La începutul acestui capitol sunt prezentate informații despre sindroame cromosomice: Down, Patau, Triplo X și Edwards. Studiul epidemiologic, clinic și cytogenetic al sindromului Down reprezintă o premieră pentru literatura de specialitate din România și indică o bună concordanță între examinarea genetică clinică și rezultatele analizei cromosomice, o prevalență crescută a anomaliilor congenitale, fiind primul studiu românesc care a calculat incidența sindromului - 1.3‰ (1/739) de nou-născuți în județul Iași. Studiul despre sindromul Patau a cuprins o cohortă semnificativă de 14 cazuri, indicând că această boală este o maladie cromosomică polimorfică severă, dar că în cazul lotului nostru triada clinică caracteristică nu a fost atât de frecventă. Cel mai sever element a fost spectrul de holoprosencefalie, care a fost asociat cu o mortalitate crescută prenatală și perinatală. Studiul retrospectiv despre trisomia X a confirmat dificultățile de idnetificare a corelațiilor genotip-fenotip, prepubertar diagnosticul fiind bazat pe retardul de creștere, dismorfia facială necaracteristică și retardul mental moderat, în timp la persoanele adulte se asociază disgenezia ovariană și dizabilitatea mentală moderată. Un alt studiu ce a vizat o boală cromosomică rară a fost cel despre sindromul Edwards, în care au fost sintetizate datele a 19 cazuri cu trisomie 18. Aspectul clinic a fost variabil, cele mai sugestive particularități fiind: RCIU, dismorfia craniofacială tipică, anomaliile cardiace, calcaneul proeminent, degetele încălecate și prematuritatea. Diagnosticul prenatal precoce al trisomiei 18 permite luarea unor decizii legate de îngrijirea neonatală și aplicarea de proceduri invazive. De asemenea, un alt studiu despre patologia cromosomică a vizat sinteza cazurilor confirmate în laboratorul nostru pe parcursul a doi ani calendaristici (2015-2016). Acest studiu a indicat importanța utilizării a diferite metode de analiză cromosomică pentru confirmarea etiologiei anomaliilor congenitale. În 44.71% din cazuri am găsit o anomalie cromosomică prin utilizarea unei strategii secvențiale de testare genetică, ce a început cu cariotipul. În cazurile cu microdeleții, confirmarea a fost realizată prin teste FISH sau MLPA. Prin metoda array-CGH au fost confirmate modificările genomice de mici dimensiuni, dar utilizarea acestei tehnici nu poate fi aplicată încă de rutină.

În a doua parte a primului capitol am prezentat trei studii ce au vizat anomalii cromosomice particulare. Primul studiu a fost rezultatul unei colaborări multicentrice asupra cromosomilor inelari (anomalie cromosomică extrem de rară). Toate cele șase cazuri au fost *de novo*, prezentând fenotipuri diferite în raport cu materialul genetic absent și instabilitatea genetică indusă de anomalie. Cariotipul reprezintă principala metodă de detecție a cromosomilor inelari, dar metodele moleculare sunt utile pentru caracterizarea completă. O a doua anomalie cromosomică neechilibrată rară a fost deleție duplicație inversată a cromosomului 8, a cărui diagnostic a fost confirmat prin array-CGH. La sfârșitul acestui capitol este prezentat un cromosom pseudodicentric 14;18 ale cărui două CNVs adiționale au fost atestate prin array-CGH.

Capitolul 2 a fost rezervat bolilor multifactoriale. Studiul etiologiei malformațiilor cardiace a indicat o frecvență crescută a anomaliilor cromosomice la pacienții cu malformații cardiace și retard mental, atestând beneficiile testării citogenetice în sindroamele plurimalformative cu anomalii congenitale cardiace. În situațiile în care cariotipul este normal, tehnicile citogenetice moleculare permit detecția anomaliilor cromosomice submicroscopice. Studiul despre dizabilitatea intelectuală a confirmat utilitatea metodei MLPA pentru identificarea anomaliilor subtelomerice, permițând găsirea a 7.5% anomalii, valoare superioară celei citată în

literatură, ceea ce confirmă eficiența utilizării celor două kit-uri de screening subtelomeric. Utilizarea kit-ului de follow-up a permis identificarea dimensiunii modificării cromosomice, aspect important pentru stabilirea semnificației clinice a anomaliilor subtelomerice. Utilizarea combinată a cariotipului și MLPA pentru detecția anomaliilor submicroscopice frecvente reprezintă o strategie eficientă pentru confirmarea diagnosticului etiologic al pacienților cu dizabilitate intelectuală, mai ales dacă array-CGH nu poate aplicată. Un alt studiu legat de patologia multifactorială a vizat hipoacuzia. Astfel, am găsit 217 pacienți cu variante patogene/probabil patogene, 141 fiind confirmate prin MLPA. Am identificat două variante noi în gena *GBJ2*: c.109G>A and c.100A>T, dar cele mai frecvente variante au fost: c.35delG, c.101T>C, c.313\_326del14 și c.71G>A. La toți pacienții cu modificări genetice acestea au fost confirmate prin secvențiere Sanger, ceea ce atestă că tehnica MLPA este o metodă performantă și ieftină ce poate fi utilizată cu succes pentru diagnosticul dificultăților auditive.

În al treilea capitol au fost prezentate rezultatele studiilor de medicină reproductivă. Întâi, am prezentat studii ce confirmă importanța analizelor citogenetice în cazul cuplurilor cu tulburări de reproducere (RD). Rezultatele studiului retrospectiv asupra 266 cupluri cu RD au fost concordante cu datele de literatură, confirmând importanța analizei cromosomice pentru diagnosticul etiologic, managementul și sfatul genetic al unor astfel de cupluri. Un alt studiu retrospectiv a vizat amenoreea confirmând că anomaliile gonosomilor reprezintă factorul etiologic major. Majoritatea pacientelor au avut disgezie ovariană și hipogonadism hipergonadotrop. În acest context, am certificat importanța analizelor citogenetice, în special cariotipul, pentru confirmarea diagnosticului la toate pacientele cu amenoree.

În a doua parte a capitolului 3 am prezentat date de medicină prenatală. Cel mai important studiu a vizat diagnosticul prenatal noninvasiv, bazat pe compararea statusului metilării ADN fetal și matern, care ar putea fi o metodă alternativă a metodelor curente invazive de diagnostic prenatal. Rezultatele obținute de noi au indicat o bună sensibilitate și specificitate, dar numărul de cazuri (doar 10) a fost insuficient pentru a furniza concluzii pertinente. Alte studii au făcut referire la aplicarea metodei FISH în diagnosticul prenatal. Primul din aceste studii a atestat utilitatea tehnicii FISH în diagnosticul prenatal indicând existența a 16,30% cazuri confirmate. Diagnosticul prenatal prin tehnica FISH permite obținerea de rezultate rapide, ceea ce reprezintă o alternativă optimă în cazurile patologice. Un alt studiu a confirmat impedimentele utilizării tehnicii FISH pentru diagnosticul prenatal al anomaliilor gonosomale, principala limitare fiind legată de imposibilitatea cuantificării cazurilor cu mozaicuri gonosomale. Un studiu multicentric a fost axat pe poliploidie, fiind discutate 39 cazuri. Diagnosticul precoce al sarcinilor cu poliploidie oferă oportunitatea unui avort terapeutic precoce. Analiza cromosomică continuă să fie metoda standard de detecție a poliploidiilor, dar metodele moleculare furnizează informații utile pentru managementul acestor cazuri. În finalul acestui capitol am prezentat managementul translucenței nucleare crescute, studiul nostru confirmând utilitatea unei examinări ecografice performante 20-24 SA pentru evaluarea prognosticului sarcinii.

În capitolul 4 au fost prezentate informații despre șase boli rare, tip de patologie ce este importantă pentru genetica medicală. Studiul cazurilor cu sindrom velo-cardio-facial a indicat existența a 6 pacienți cu microdeleție 22q11.2, dar aceste cazuri reprezintă doar vârful icebergului. Spectrul clinic al sindromului DiGeorge este extrem de variabil, iar confirmarea diagnosticului necesită aplicarea de tehnici citogenetice moleculare la cazurile cu fenotip evocator selectate pe baza unor algoritmi clinici. Cazul cu Limb Body Wall Complex, detectat prenatal și investigat anatomopatologic, confirmă importanța colaborării dintre obstetricieni, geneticieni și anatomopatologi în elucidarea unor anomalii de dezvoltare prenatală. Sindromul Pallister-Killian este o boală rară, iar cohorta noastră de cinci cazuri reprezintă un număr important ce a permis identificarea unor trăsături particulare (exces de păr pe frunte și urechi, anomalii oculare, episoade repetate de infecție și disfuncție autonomă, anomalii senzoriale complexe și mișcări mioclonice). MLPA și array CGH s-au dovedit a fi metode adecvate pentru

diagnosticul acestei boli și ar trebui să reprezinte tehnicile de primă intenție pentru confirmarea supoziției clinice. Boala Gorham-Stout este o maladie multifactorială caracterizată prin osteoliză masivă și prognostic negativ. Principalele elemente de prognostic negativ sunt: leziunile osteolitice ale coloanei vertebrale și pleurei. Sindromul Holt-Oram este o boală pleiotropă, în care principalele regiuni anatomiche modificate sunt cordul și membrele superioare. Din cauza expresivității variabile diagnosticul este deseori întârziat. Realizarea unui diagnostic precoce permite prevenirea complicațiilor și identificarea altor membri afectați ai familiei. Osteogenesis imperfecta (OI) este o boală rară caracterizată prin eterogenitate genetică. În aceste condiții, căutarea mutațiilor genelor implicate în patogenia OI impune utilizarea secvențierii întregului exom ca metodă de primă intenție. Analiza computerizată a variantelor patogenice prin folosirea de programe speciale este obligatorie pentru clasificarea mutației, în special pentru oferirea sfatului genetic prenatal.

Direcțiile viitoare de dezvoltare profesională vor viza în principal diagnosticul prenatal, patologia malformativă, tulburările reproductive, domeniile genomicii, oncogeneticii și patologiei bolilor rare, pentru unele direcții fiind deja implicat în programe de cercetare.

A handwritten signature in blue ink, reading "Dr. Sorduze". The signature is written in a cursive, flowing style. The text is centered within a light-colored rectangular box.