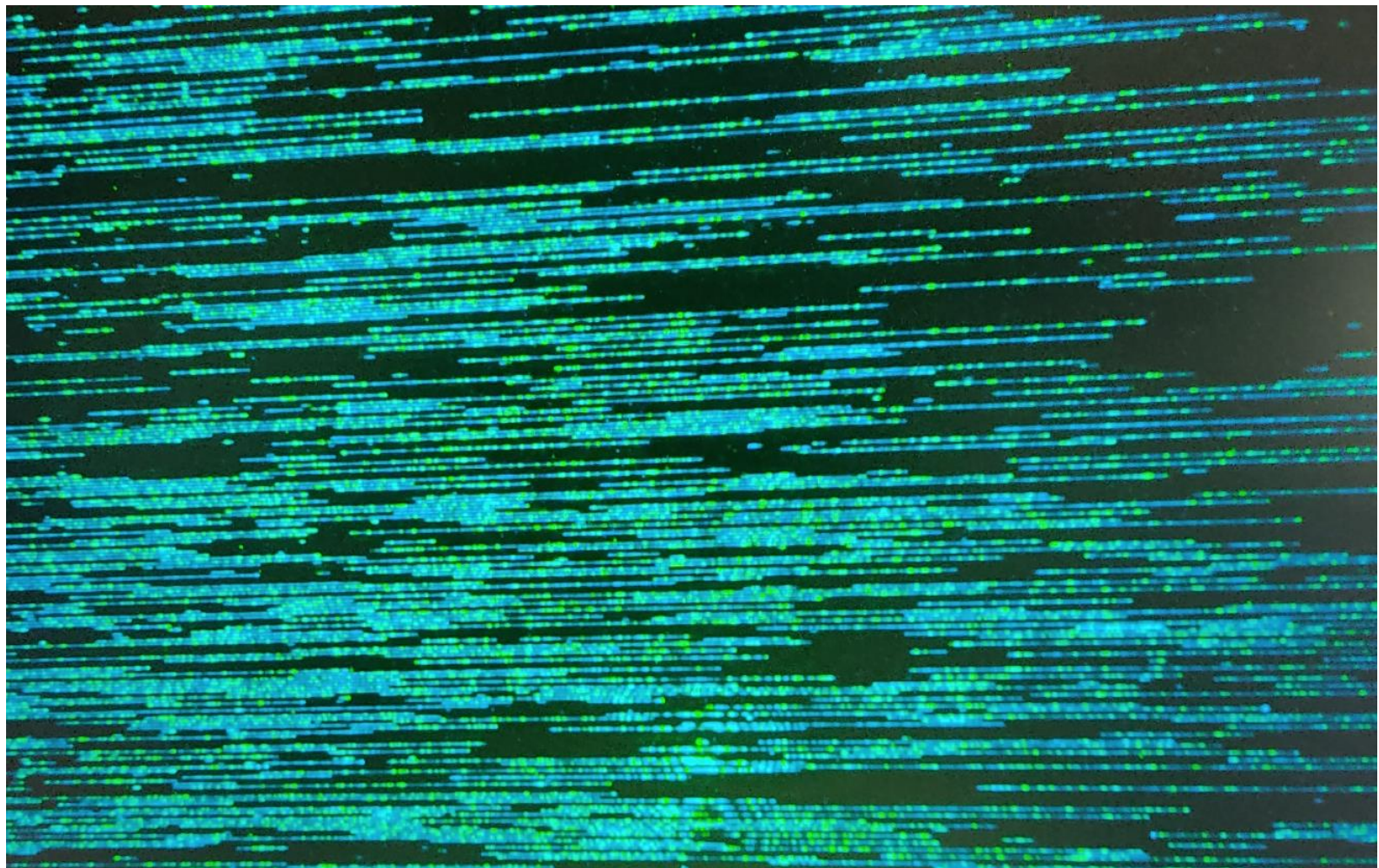


ZDRUŽENJE ZA
MEDICINSKO GENETIKO

NOVOSTI NA PODROČJU REDKIH BOLEZNI V SLOVENIJI

8. Simpozij slovenske medicinske genetike

UKC Ljubljana, 10. november 2023





ZDRUŽENJE ZA
MEDICINSKO GENETIKO
Slovensko zdravniško društvo

NOVOSTI NA PODROČJU REDKIH BOLEZNI V SLOVENIJI

8. Simpozij slovenske medicinske genetike

Knjiga povzetkov

UKC Ljubljana, 10. november 2023

**8. Simpozij slovenske medicinske genetike
NOVOSTI NA PODROČJU REDKIH BOLEZNI V SLOVENIJI**

Organizator

Združenje za medicinsko genetiko, Slovensko zdravniško društvo

Organizacijski in znanstveni odbor

Predsednik Luca Lovrečič
Člani Ivana Babić Božović
Maruša Debeljak
Matija Rijavec
Gorazd Rudolf
Vida Stegel
Nataša Teran
Karin Writzl
Andreja Zagorac

Uredniki

Ivana Babić Božović
Luca Lovrečič

Založba in letnica izida

Združenje za medicinsko genetiko, Slovensko zdravniško društvo, 2023

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
[COBISS.SI-ID 170719235](#)
ISBN 978-961-93050-6-5 (PDF)

Program

Nacionalni načrt dela na področju redkih bolezni <i>Robert Medved</i>	6
Evropske referenčne mreže v Sloveniji <i>Luca Lovrečić</i>	7
Nacionalni register bolnikov z redkimi boleznimi <i>Urh Grošelj</i>	9
Odkrivanje novih genov za redke bolezni <i>Aleš Maver</i>	11
Postopek pridobitve dovoljenj za promet z zdravili sirotami v Evropski uniji <i>Ana Videnšek Podgorelec</i>	12
Razvoj genske terapije <i>Damjan Osredkar</i>	14
Genetski vzroki hipertrofične kardiomiopatije v slovenski populaciji <i>Nina Vodnjov</i>	19
Diagnostika redkih bolezni preko univerzalnega nacionalnega programa presejanja na celokupni holesterol pri predšolskih otrocih <i>Urša Šuštar</i>	21
Odkrivanje vzrokov za prirojeno eritrocitozo pri slovenskih bolnikih <i>Aleša Kristan</i>	22
Dedna alfa-triptazemija <i>Matija Rijavec</i>	25
Genetska diagnostika motenj avtističnega spektra z retrospektivno analizo diagnostičnega izplena z vključeno dizmorfološko oceno preiskovancev <i>Gaber Bergant</i>	27
Urejenost sladkorne bolezni tipa 1 in DNA metilacija <i>Barbara Čugalj Kern</i>	28
Dopolnitev eksomskega in genomskega sekvenciranja s sekvenciranjem RNA v diagnostiki monogenških bolezni: prikaz uporabe analize RNA na kliničnih primerih <i>Barbara Golob, Tanja Višnjar</i>	29
Reklasifikacija različic nejasnega kliničnega pomena z analizo mRNA iz krvi <i>Vita Šetrajčič Dragoš</i>	32

Patogene različice v genih, povezanih z dednimi oblikami ginekoloških rakov v slovenski populaciji <i>Urša Kotnik</i>	33
Različno izražene miRNA pri pediatričnih bolnikih z nefroblastomom <i>Tine Tesovnik</i>	35
Diagnostični izzivi pri sindromu CANVAS <i>Ivana Babić Božović</i>	37
Sponzorji	39

Načrt dela na področju redkih bolezni za obdobje 2021 do 2030

Robert Medved, sekretar

Ministrstvo za zdravje

Ministrstvo za zdravje (v nadaljnjem besedilu ministrstvo) je že sorazmerno zgodaj pristopilo k urejanju področja redkih bolezni. Že leta 2011 je bil pripravljen in leta 2012 sprejet prvi Načrt dela na področju redkih bolezni. Ob poteku veljavnosti prvega načrta dela je ministrstvo imenovalo delovno skupino, ki je pripravila Načrt dela na področju redkih bolezni za obdobje 2021 do 2030, ki bo predstavljen v predavanju.

Na osnovi Načrta dela na področju redkih bolezni za obdobje 2021 do 2030 in Akcijskega načrta za leti 2022 in 2023 je ministrstvo v letu 2022 uspelo zagotoviti tudi sredstva za financiranje področja redkih bolezni v Aneksu 1 k Splošnemu dogovoru za leto 2022 (v nadaljnjem besedilu Aneks 1) v skupni vrednosti preko 4 mio EUR, in sicer 1.643.481,00 EUR letno za financiranje štirih specializiranih multidisciplinarnih timov za obravnavo redkih bolezni, slovenskega vozlišča za evropske referenčne mreže, centra za nediagnosticirane redke bolezni in registra redkih nemalignih bolezni ter 1.926.868,24 EUR letno za uvedbo programa presejanja novorojencev za spinalno mišično atrofijo, težke prirojene okvare imunosti, cistično fibrozo in kongenitalno adrenalno hiperplazijo. Zgoraj omenjena financiranja so zagotovljena od 1. 9. 2022 dalje. Dodatno je bilo zagotovljenih še 764.000,00 EUR letno za program celostne obravnave otrok in mladostnikov s cistično fibrozo od 1. 1. 2023 dalje.

Področje redkih bolezni je trenutno eno izmed najhitreje razvijajočih se medicinskih področij, ki z razvojem medicinske genetike omogoča, da strokovnjaki odkrivajo nove bolezni praktično na dnevni ravni. Z Načrtom dela na področju redkih bolezni za obdobje 2021 do 2030 želi Ministrstvo za zdravje še naprej zagotavljati bolnikom z redkimi boleznimi ustrezno in sodobno oskrbo.

Evropske referenčne mreže v Sloveniji

Luca Lovrečič

Klinični inštitut za genomsko medicino, UKC Ljubljana

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

e-mail: luca.lovrecic@kclj.si

Področje redkih bolezni (RB) je bilo prepoznano kot eden pomembnejših izzivov na nivoju EU, ki si je skupaj z nacionalnimi vladami zastavila cilj, da izboljša prepoznavanje in zdravljenje RB s krepitvijo sodelovanja na evropski ravni, z usklajevanjem in podpiranjem nacionalnih načrtov za RB ter z direktivo o pravicah pacientov pri čezmejnem zdravstvenem varstvu. Tako je Evropska komisija z delegiranim sklepom komisije določila merila in pogoje, ki jih morajo izpolnjevati evropske referenčne mreže in izvajalci zdravstvenega varstva, ki se želijo pridružiti mreži ter z izvedbenim sklepom določila merila za ustanavljanje, vrednotenje evropskih referenčnih mrež in njihovih članov ter lažjo izmenjavo informacij in strokovnega znanja.

Ustanovljenih je bilo 24 evropskih referenčnih mrež (ERM), razdeljenih po tematskih področjih. Te virtualne mreže povezujejo izvajalce zdravstvenih storitev po celi Evropi s ciljem zdravljenja kompleksnih in redkih bolezni, ki zahtevajo visoko specializirano obravnavo ter koncentracijo znanja in virov. Pričakuje se, da bodo ERM pomembno okrepile svoje zmogljivosti in tako pomagale tisočem evropskih bolnikov, ki trpijo za redkimi ali kompleksnimi boleznimi. Glavni cilji ERM so izboljšanje ozaveščenosti o RB in njihovih kompleksnih kliničnih znakih in simptomih tako v laični kot v strokovni javnosti, izboljšanje možnosti za zgodnjo in natančno diagnozo in čim bolj učinkovito zdravljenje, če je na voljo. V vsem tem je veliko deležnikov, ki pokrivajo vsa področja - prepoznavanje, diagnostiko, zdravljenje, podporno terapijo, sodelovanje z združenji bolnikov, psihološko in socialno podporo. Praviloma lahko le terciarne zdravstvene inštitucije na nivoju države pokrivajo vsa ali večino tematskih področij.

Zaradi specifikave posameznih držav članic je predvideno, da so specializirani centri v državi prepoznani in imenovani na nivoju ustreznih teles, v Sloveniji s strani Ministrstva za zdravje. Nato lahko kandidirajo za pridruževanje v posamezno referenčno mrežo na nivoju Evrope.

V majhnih državah predstavljajo redke bolezni še večji izziv. Mnoge se pojavljajo s prevalencami 1/50.000, celo 1/1.000.000, kar pomeni, da se v povprečju zdravnik v svoji strokovno delovni karieri praviloma ne sreča z bolnikom ali pa obravnava samo enega. V 80 % so RB genetskega izvora. Obravnava RB je zaradi njihove redkosti, genetske narave, prizadetosti več organskih sistemov in kroničnega poteka bolezni specifična. Njihova redkost zahteva multidisciplinarni pristop, specialistično obravnavo z visoko usposobljenimi strokovnjaki, specialno diagnostiko, prav tako je kompleksno zdravljenje. Zaradi kronične narave teh bolezni je potrebna psihološko in socialna podpora, zaradi genetske narave so pogosto prizadete in v obravnavi cele družine. Ker je redkih bolezni preko 6000 je nemogoče biti kompetenten za vse. Še več, nemogoče je, da bi pričakovali, da ima Slovenija vrhunske strokovnjake za vsako izmed njih ali za skupine posameznih bolezni na vseh trenutno obstoječih 24 tematskih področjih/skupinah, za katere so ERM že ustanovljene. Nenazadnje pa znanje na področju RB eksponentno narašča in posledično narašča tudi števila novo prepoznanih RB.

Tudi Evropska komisija je predvidela, da ni mogoče, da imamo vse države članice vrhunske referenčne centre za vsa področja redkih bolezni, ter tako predvidela različne oblike članstva: polnopravno članstvo, pridruženo članstvo ter posebno obliko, takoimenovano koordinacijsko središče/vozlišče za več različnih ERM mrež. Slednje bi tako strokovno povezovalo ustrezne izvajalce zdravstvenega varstva in strokovne centre tako na nivoju EU kot tudi nacionalno.

Ministrstvo za zdravje je s sklepom že imenovalo Klinični inštitut za genomsko medicino, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija, kot nacionalno vozlišče za evropske referenčne mreže, h katerim se Slovenija ni priključila kot polnopravna ali pridružena članica. Na ta način je Slovenija uspešno povezana v vseh 24 evropskih referenčnih mrež.



ERM v Sloveniji

Polnopravno članstvo	Pridruženo članstvo	Nacionalno vozlišče
ERN-RND 	ERN Skin 	ERN BOND
ERN EURO-NMD 	ERN GUARD-HEART 	ERNICA
MetabERN 	ERN CRANIO 	ERN EuroBloodNet
ERN ReCONNET 	ERN VASCERN 	eUROGEN
ERN RITA 	ERN LUNG 	ERN ITHACA
Endo-ERN 		ERN RARE-LIVER
ERN PeadCAN 		ERN TRANSPLANT-CHILD (v postopku)
ERN EpiCARE 		
ERN EYE 		
ERN EURACAN 		
ERN ERKNet 		
ERN-GENTURIS 		

Slika 1: Članstvo Sloveniji v evropskih referenčnih mrežah

Viri:

1. *Delegirani sklep komisije z dne 10. marca 2014 o določitvi meril in pogojev, ki jih morajo izpolnjevati evropske referenčne mreže in izvajalci zdravstvenega varstva, ki se želijo pridružiti evropski referenčni mreži (Besedilo velja za EGP) (2014/286/EU), Uradni list Evropske unije.*

2. *Izvedbeni sklep komisije z dne 10. marca 2014 o določitvi meril za ustanavljanje in vrednotenje evropskih referenčnih mrež in njihovih članov ter za lažjo izmenjavo informacij in strokovnega znanja o ustanavljanju in vrednotenju takih mrež (Besedilo velja za EGP) (2014/287/EU), Uradni list Evropske unije.*

3. *European Reference Networks: Skupaj za bolnike z redkimi boleznimi, boleznimi z nizko stopnjo prevaleance in kompleksnimi boleznimi. Share.Care.Cure. ISBN 978-92-79-65500-5. doi:10.2875/41029. Catalogue number: EW-04-17-100-SL-N.*

4. *3rd conference on European Reference Networks, Conference report, 9-10 March, 2017, Vilnius.*

5. *Wijnen R, Anzelewicz SM, Petersen C, Czauderna P. European Reference Networks: Share, Care, and Cure-Future or Dream? Eur J PEdiatr Surg, 2017.*

6. *Taruscio D, Gentile AE, Evangelista T, Frazzica RG, Bushby K, Montserrat AM. Centres of Expertise and European Reference Networks: key issues in the field of rare diseases. The EUCERD Recommendations. Blood Transfus 2014.*

7. *Héon-Klin v. European Reference networks for rare diseases: what is the conceptual framework? Orphanet Journal of Rare Diseases, 2017.*

Nacionalni register bolnikov z redkimi nemalignimi boleznimi

Urh Grošelj

KO za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana;

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani



V EU so redke bolezni (RB) opredeljene kot tiste, ki prizadenejo 5/10.000 oseb. Več RB že odkrivamo s programom presejanja novorojencev tudi v Sloveniji. Skupaj obstaja preko 8.000 različnih RB, ki po nekaterih ocenah skupno prizadenejo 6-8 % prebivalstva. RB so praviloma tudi kronične, pogosto tudi napredujoče in degenerativne. V 80 % primerov so RB genetskega izvora; v okrog 70 % prizadenejo pediatrično populacijo; pogosto so neozdravljive in neredko tudi življenje ogrožujoče. RB s tem pogosto močno zaznamujejo kakovost življenja bolnikov in njihovih bližnjih. RB imajo veliko skupnih značilnosti in drugih posebnosti, ki v praksi predstavljajo resne izzive za zdravstvene delavce in zdravstveni sistem pri zagotavljanju uspešnega zdravljenja te skupine pacientov. Čeprav za večino RB ne poznamo zdravila, pri nekaterih lahko preprečujemo zaplete ali z različnimi medicinskimi posegi izboljšujemo kakovost življenja bolnikov. Glede na to, da v Evropi RB prizadanejo skupaj kar 30 milijonov ljudi (in približno 400 milijonov po vsem svetu), je nujno potreben sistematični javno-zdravstveni pristop k temu problemu. V Sloveniji je po nekaterih grobih ocenah približno 150.000 bolnikov z RB, kar pomeni, da je to področje zelo pomembno za slovenski zdravstveni sistem. Redkost teh bolezni pogosto po eni strani povzroča težave pri njihovem prepoznavanju in zgodnjem diagnosticiranju, po drugi strani pa kroničnost teh bolezni pogosto zahteva kompleksno in dolgotrajno zdravljenje in celostno obravnavo. Natančni epidemiološki podatki so pomembni, da lahko bolje prikažejo dejanske potrebe pri obravnavi teh pacientov, tudi v luči obstoječih kapacitet ali njihovega prihodnjega načrtovanja.

Registri RB v tem smislu predstavljajo enega temeljnih instrumentov za zbiranje epidemioloških podatkov, spremljanje RB ter omogočajo podlago za epidemiološke ali klinične raziskave in lahko na ta način močno prispevajo k izboljšanju načrtovanja zdravstvenega varstva in zdravljenja bolnikov z RB. Zato so informacijske in komunikacijske tehnologije (IKT) zelo pomembne v celovitem ekosistemu RB, saj pomagajo pri zbiranju, shranjevanju, analizi in poročanju ustreznih podatkov o RB. V tehnološkem in podatkovnem smislu register RB predstavlja bazo podatkov vključenih posameznikov, ki vsebujejo jasno opredeljen nabor zdravstvenih in demografskih podatkov, zbranih za javno-zdravstveni (epidemiološki) namen. Po drugi strani pa bi bilo mogoče registracijo opredeliti kot proces neprekinjenega sistematičnega zbiranja podatkov o pojavu in značilnostih proučevanih zdravstvenih pojavov, da se zagotovi celovita ocena njihovega obsega in vpliva na prebivalstvo in je tako mogoče zahtevane ukrepe učinkoviteje načrtovati. Poleg tega lahko registri omogočajo nadzor razširjenosti in pojavnosti RB, opazovanje drugih pomembnih parametrov in omogočajo utemeljeno vrednotenje različnih vidikov zdravstvene oskrbe, izidov zdravljenja ter naravnega poteka bolezni te skupine bolnikov. Kakovostni registri RB zagotavljajo koristno in veljavno platformo v vseh fazah dokazovanja utemeljene zdravstvene politike in lahko pomembno prispevajo k napredku pri obvladovanju RB na splošno. Iz teh razlogov je razvoj

registrov RB prepoznan kot ena od prednostnih nalog EU na področju spremljanja in nadzora RB, kar dokazujejo posebna priporočila in ukrepi za podporo razvoju takšnih registrov v različnih zdravstvenih resolucijah in strateških dokumentih EU.

Nacionalni register redkih nemalignih bolezni (RRNB) je bil vključen v predlagano spremembo Zakona o zbirkah podatkov o zdravstvenem varstvu (ZZPPZ, Uradni list RS, št. Republika Slovenija, št. 65/00, 47/15, 31/18). Že v okviru CRP »Analiza in razvoj redkih bolezni v Sloveniji« (2015-2017) so bila oblikovana izhodišča za razvoj registra RB v Sloveniji, o čemer smo kasneje poročali v znanstveni in strokovni literaturi. Zatem je bila v letu 2020 formirana delovna skupina za vzpostavitev RRNB v okviru Ministrstva za zdravje. Koncem leta 2023 bomo predvidoma po nekaj letih priprav v prakso implementirali RRNB, v novembru 2023 že načrtujemo izvedbo prvih registracij pacientov. V letu 2024 načrtujemo ustrezno kadrovsko, tehnično in prostorsko ureditev RRNB, in širšo implementacijo RRNB v Sloveniji, z aktivnim vključevanjem vseh ključnih deležnikov in strokovnjakov, ki se ukvarjajo s področjem RB.

Viri:

1. Choquet, R., Maaroufi, M., de Carrara, A., Messiaen, C., Luigi, E., Landais, P. (2015). *A methodology for a minimum data set for rare diseases to support national centers of excellence for healthcare and research.* *J Am Med Inform Assoc JAMIA*, 22(1), 76-85.
2. *European Union Committee of Experts on Rare Diseases – EUCERD (2013). Recommendations on Rare Disease Patient Registration and Data Collection.* European Commission, Brussels.
3. *Eurordis (2013). Rare disease patient registries. Policy fact sheet.* EURORDIS – Rare Diseases Europe, European Commission, Brussels.
4. Stanimirovic D, Murko E, Battelino T, Groselj U. *Development of a pilot rare disease registry: a focus group study of initial steps towards the establishment of a rare disease ecosystem in Slovenia.* *Orphanet J Rare Dis.* 14(1):172.
5. Stanimirovic D, Murko E, Battelino T, Groselj U. *Charting Early Developmental Trajectory of a Pilot Rare Disease Registry in Slovenia.* *Stud Health Technol Inform.* 2020 Jun 26;272:213-216.

Odkrivanje novih genov za redke bolezni

Aleš Maver

Klinični inštitut za genomsko medicino, UKC Ljubljana

Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Redke bolezni predstavljajo enega vodilnih zdravstvenih izzivov v današnjem času. Preko 80% redkih bolezni se pojavi zaradi patoloških sprememb v zapisu človeškega genoma. Opredelitev vzročne spremembe v dednem zapisu je temelj za potrditev diagnoze, spremljanja bolnikov, preventivnih ukrepov, pogosto pa šele na podlagi ugotovljene spremembe pri nediagnosticiranih bolnikih postavimo diagnozo, kar v posameznih primerih lahko neposredno vpliva na obravnavo bolnikov in zdravljenje.

Poznavanje etiologije genetskih bolezni je osnovni pogoj, ki omogoča postavitev diagnoze, ustrezno spremljanje in napovedovanje bolezni v družini in pri potomcih. Nove tehnologije sekvenciranja nove generacije so v zadnjem času diagnostiko bistveno pospešile in jo naredile dostopno v slovenskem zdravstvenem sistemu. Kljub temu pri preko 50% bolnikov v doslej znanih genih ne ugotovimo molekularnega vzroka težav in bolniki ostanejo nediagnosticirani.

Nove genomske metode, predvsem sekvenciranja nove generacije, smo v Sloveniji vpeljali v zdravstveni sistem med prvimi državami v Evropi, kar je v zadnjem času poleg bistveno učinkovitejše diagnostike omogočilo tudi možnost hitrega odkrivanja novih vzrokov genetskih bolezni. Na Kliničnem inštitutu za genomsko medicino smo z vpeljavo izvirnih bioinformatičnih poti, povezovanjem z mednarodnimi centri in doslednim vključevanjem v mednarodna omrežja nediagnosticiranih bolnikov, uspeli v zadnjem desetletju prispevati pri odkritju preko 15 novih povezav med geni in dednimi boleznimi človeka. Omenjena odkritja vključujejo nove vzroke epilepsije, nevrorazvojnih motenj, sindroma prezgodnje staranja, kardioloških bolezni in drugih. Nove povezave vključujejo tako identifikacijo genov, ki doslej še niso bili povezani z dednimi boleznimi, odkrivanje novih genetskih sindromov, kakor tudi ugotavljanje novih genetskih bolezni oziroma sindromov, s katerimi so povezani že znani geni. Naše izkušnje kažejo, da pri vsakem 300-tem bolniku, pri katerem opravimo analizo eksomskega ali genomskega sekvenciranja, ugotovimo najdbe, s katerimi dopolnimo trenutno poznavanje redkih genetskih bolezni in njihovih vzrokov.

Poglobljena analiza podatkov eksomskega in genomskega sekvenciranja in dosledna raba mednarodnih omrežij za nediagnosticirane bolnike sta v zadnjem desetletju omogočili povsem nove možnosti za odkrivanje novih vzrokov genetskih bolezni v slovenskem prostoru. Pri številnih bolnikih s tem skrajšamo večletno iskanje diagnoze na dobo nekaj mesecev. Identifikacija novih povezav med geni in redkimi boleznimi pri človeku je tako postala nov izhod genetskega testiranja tudi v rutinski diagnostični obravnavi.

Postopek pridobitve dovoljenj za promet z zdravili sirotami v Evropski uniji

Ana Videnšek Podgorelec

Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke

1. Zakonodaja Evropske unije na področju zdravil sirot

Z namenom podpore razvoja novih zdravil za zdravljenje redkih bolezni (zdravil sirot) in spodbuditev večjega dostopa do takšnih zdravljenj v Evropski uniji (v nadaljevanju EU), je Evropska komisija leta 2000 sprejela Uredbo (ES) št. 141/2000 o zdravilih sirotah (v nadaljevanju uredba). Uredba je uvedla spodbude in regulativne nagrade za razvijanje zdravil za bolnike z redkimi boleznimi, saj je bilo zanimanje farmacevtske industrije za razvoj zdravil sirot zaradi tržne nezanimivosti nezadostno (1).

1.1. Definicija zdravila sirote

V skladu z uredbo so zdravila sirote definirana kot zdravila, ki so namenjena za diagnosticiranje, preprečevanje ali zdravljenje zelo resnih, to je življenjsko ogrožajočih ali kronično izčrpavajočih zelo redkih bolezni, ki prizadenejo do največ 5 na 10 000 oseb in za katere ni druge zadovoljive metode zdravljenja. Obenem zanje ni verjetno, da bi bil promet z njimi brez spodbud dovolj donosen za upravičenje potrebne naložbe v raziskave in njihov razvoj (2).

1.2. Določitev oznake za zdravilo sirota

Za zdravila sirote pred dovoljenjem za promet, torej še v fazi razvoja, poteka pridobitev določitve oznake za zdravilo siroto, kar pomeni, da so pravne ali fizične osebe, ki razvijajo ta zdravila, upravičene do znanstvenih in finančnih spodbud pri razvoju zdravila npr. brezplačno strokovno svetovanje za ustrezno načrtovanje predkliničnih in kliničnih študij ter znižane pristojbine za postopek pridobitve dovoljenja za promet. Določitev oznake za zdravilo siroto, ki pomeni oceno ali zdravilo zadosti pogojem, ki so definirani za opredelitev zdravila sirote, poteka v okviru znanstvenega Odbora za zdravila sirote, ki je strokovni organ pri Evropski agenciji za zdravila (3).

Odbor za zdravila sirote je v obdobju od leta 2000–2022 obravnaval 4.198 vlog za določitev oznake zdravila sirote, od katerih jih je za oznako zdravila sirote predlagal 2.748. Od prvotnih 4.198 zdravil pa jih je le približno 231 v nadaljevanju postopka pridobitve dovoljenja za promet pridobilo status zdravila sirote in izpolnilo tudi vse druge pogoje (dokaz kakovosti, učinkovitosti in varnosti) za pridobitev dovoljenja za promet oziroma za prihod na tržišče (4).

1.3. Pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom sirota

Odbor za zdravila v humani medicini pri Evropski agenciji za zdravila pripravi znanstveno oceno kakovosti, varnosti in učinkovitosti zdravila sirote po centraliziranem postopku, ki je za zdravila sirote obvezen. V odboru sodelujejo najvidnejši strokovnjaki medicinske, farmacevtske in drugih strok iz vseh držav članic EU, tudi iz Slovenije. Izdelano stališče odbora se odraza v mnenju Evropske agencije za zdravila, ki je podlaga za nadaljnji postopek izdaje dovoljenja za promet z zdravilom pri Evropski komisiji. V primeru ugotovljenega pozitivnega razmerja med koristmi in tveganji pri uporabi zdravila je izdano dovoljenje veljavno v vseh državah članicah EU, torej tudi v

Sloveniji. Evropska komisija javno objavlja podatke o vseh izdanih dovoljenjih za promet. Zdravila sirote ob pridobitvi dovoljenja za promet pridobijo deset let tržne zaščite (5).

2. Predlagane spremembe evropske zakonodaje na področju zdravil sirot

Ocena obstoječe farmacevtske zakonodaje na področju zdravil za redke bolezni je pokazala, da je uredba pospešila razvoj in dostopnost zdravil za bolnike z redkimi boleznimi. S sistemom spodbud in nagrad je prišlo do preusmeritve zasebnih ter javnih investicij v prej zapostavljena področja razvoja. Število zdravil za bolnike z redkimi boleznimi se je povečalo. Vendar pa je ocena tudi pokazala, da obstaja prostor za izboljšave, saj uredba ni zadostno spodbudila razvoja na področjih, kjer je potreba po zdravilih največja. Zdravila so se razvijala na terapevtskih področjih, ki so bolj dobičkonosna in za katera se število obstoječih zdraviljenj povečuje (6).

Evropska komisija je 26. aprila 2023 objavila predlog reforme farmacevtske zakonodaje EU, ki se nanaša tudi na področje zdravil sirot. Glavni cilji sprememb na področju zdravil za redke bolezni so usmerjeni k uravnoteženju spodbud in nagrad s ciljem preusmeritve razvoja zdravil na področja velikih nepokritih medicinskih potreb, saj za 95 % redkih bolezni še vedno ni odobrenih zdravil, ter omogočiti enakovreden dostop bolnikov do teh zdravil po vsej EU (7).

Viri:

1. *European Commission. Study to support the evaluation of the EU Orphan Regulation, 2019. Orphan Regulation study_final report_anonymised (europa.eu).*
2. *Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products (OJ L 18, 22.1.2000). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02000R0141-20190726>.*
3. *European Medicines Agency. Orphan designation: Overview. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/orphan-designation-overview>.*
4. *European Medicines Agency. Orphan Medicinal Product Designation, Overview 2000-2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/orphan-medicines-figures-2000-2022_en.pdf.*
5. *Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency (OJ L 136, 30.4.2004). <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02004R0726-20190128>.*
6. *European Commission. Joint evaluation of Regulation (EC) No 1901/2006 of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on medicinal products for paediatric use and Regulation (EC) No 141/2000 of the European Parliament and of the Council of 16 December 1999 on orphan medicinal products, 2020. https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-08/orphan-regulation_eval_sw_d_2020-163_part-1_0.pdf.*
7. *European Commission. Reform of the EU pharmaceutical legislation, 2023. https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/pharmaceutical-strategy-europe/reform-eu-pharmaceutical-legislation_en.*

Razvoj zdravila za redko bolezen (CTNNB1 sindrom)

Damjan Osredkar

*Klinični oddelek za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana
Center za razvojno nevroznanost, Medicinska fakulteta Ljubljana, Univerza v Ljubljani*

O sindromu CTNNB1

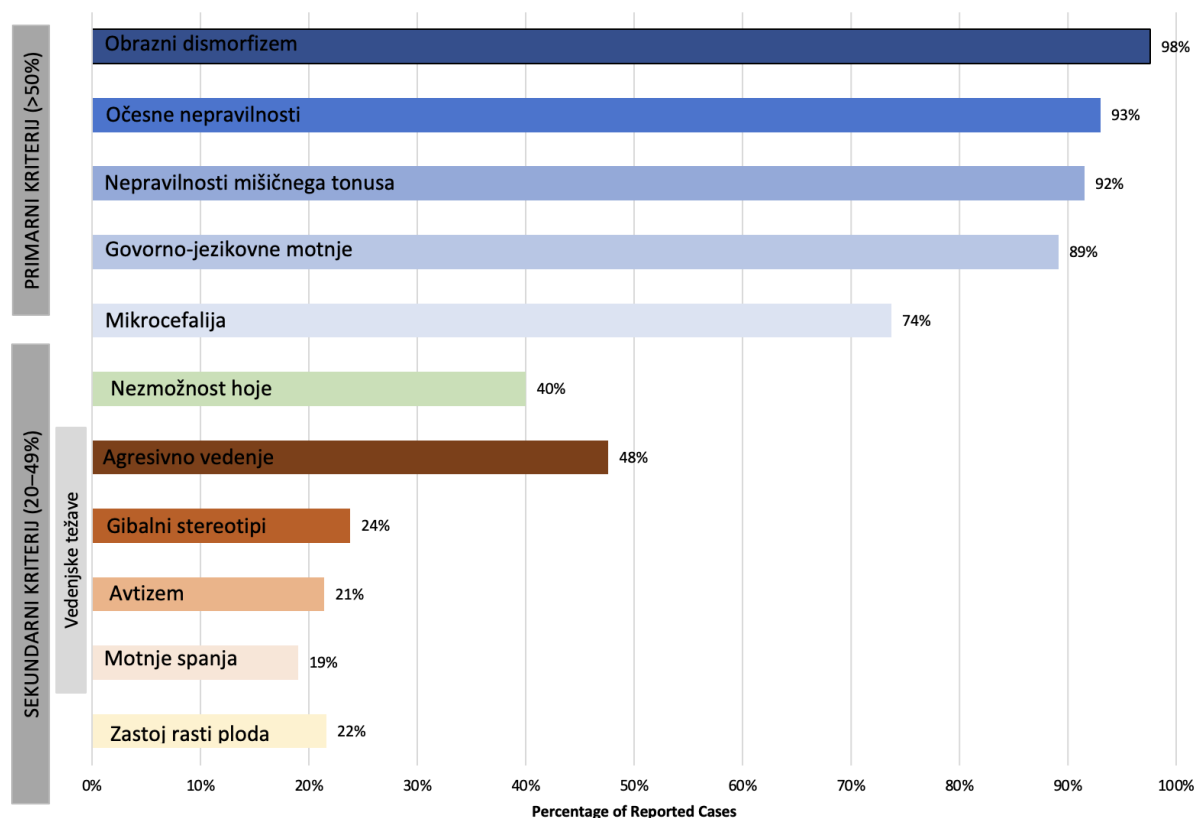
Sindrom CTNNB1 je nevrološko razvojna motnja, ki jo povzročajo različne de novo točkovne mutacije, ki vodijo do izgube funkcije v enem izmed alelov gena CTNNB1. Izguba funkcije v genu CTNNB1 je bila prvič opisana leta 2012 pri posameznikih s hudo motnjo v duševnem razvoju¹ in od takrat je postal izraz sindrom CTNNB1 generični izraz za vse motnje, povezane s haploinsuficienco gena CTNNB1.

Trenutno je motnja diagnosticirana pri približno 400 bolnikih v svetu, vendar je to število zelo verjetno močno podcenjeno. Na primer, pri približno eni tretjini bolnikov s cerebralno paralizo, je mogoče najti gensko motnjo, ki pojasnjuje nastanek motenj gibanja, mutacija CTNNB1 gena pa je med najpogostejšimi genskimi etiologijami.² V nasprotju s cerebralno paralizo pa je sindrom CTNNB1 napredujoča bolezen, povezana s pomembno obolevnostjo in umrljivostjo, ki prizadene bolnike skozi celotno življenjsko obdobje. Ker gre za izrazito redko bolezen, incidenca je ocenjena na 1/50.000 rojenih otrok, številni vidiki spektra bolezni še niso jasni.

Bolezen je avtosomno dominantna, zato za patološki fenotip zadostuje mutacija na enem alelu. Gen CTNNB1 se nahaja na kromosomu 3 in ga sestavlja 16 eksonov, kjer eksoni 2-15 (2346 bp) kodirajo zapis za β -katenin. Mutacije, povezane s sindromom CTNNB1, je mogoče razvrstiti v več vrst (nesmiselne, drugačnosmiselne, premik bralnega okvirja in mutacije spajanja) in se lahko pojavijo v celotnem kodirajočem območju CTNNB1.

Gen CTNNB1 kodira protein β -katenin, ki spada v družino armadillo strukturnih proteinov in ima pomembno vlogo tako pri embrionalnem razvoju kot pri homeostazi pri odraslih. β -katenin ima dve bistveni vlogi: deluje kot transkripcijski kofaktor na signalizacijski poti Wnt in kot sidro pri znotrajceličnih stikih ter celični adheziji^{3,4}. Pri transkripcijski regulaciji se β -katenin premakne v jedro, kjer sodeluje z družino transkripcijskih faktorjev TCF-LEF, ki uravnavajo izražanje različnih razvojnih genov, kot sta MYC in CCND1^{4,5}. Mnogi od teh genov veljajo za onkogene in prekomerno izražanje β -katenina je znan dejavnik, ki prispeva k razvoju raka, zato so ravni citosolnega β -katenina strogo nadzorovane preko sprotne razgradnje v degradacijskem kompleksu. Druga pomembna vloga β -katenina je strukturna, saj z α -kateninom in znotrajcelično domeno E-kadherina sestavlja membranske komplekse, ki služijo kot celična sidra. Kadherini, vezani na membrano, so družina beljakovin, ki posredujejo sinaptično povezljivost prek medceličnih adhezijskih procesov⁶. Domene za interakcije z znotrajceličnimi kadherinskimi domenami obsegajo celotno osrednje območje ponovitev armadillo β -katenina, kar omogoča procese, kot so celična adhezija, migracija celic, izražanje nevrinov in sinaptično preoblikovanje⁷.

Sindrom CTNNB1 se kaže v množici različno resnih razvojnih motenj, pa tudi s hipotonijo, spastičnostjo, kognitivnimi motnjami, težavami z govorom, vidom, mikrocefalijo⁸. Najpogostejše težave povezane s sindromom predstavlja slika 1.



Slika 1. Najpogostejše težave povezane s sindromom CTNNB1.9

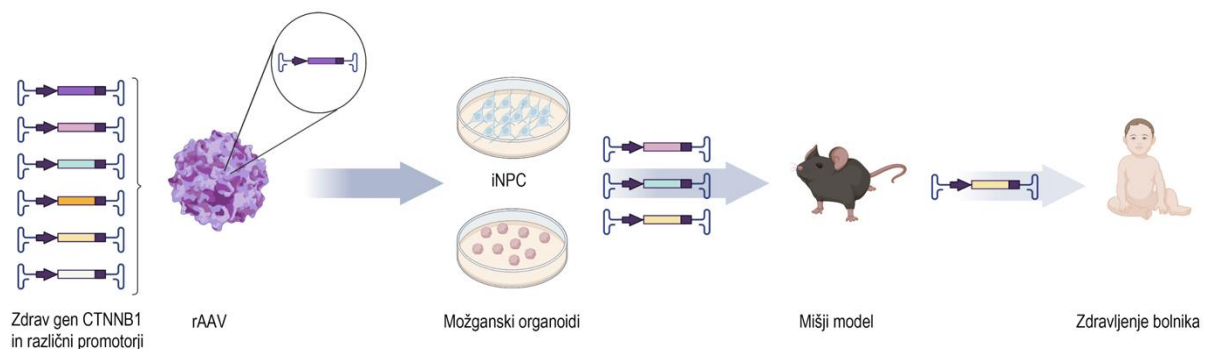
Bolnik z redko boleznijo, sindromom CTNNB1

Ko smo na Kliničnem oddelku za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo (KOOMRN) Pediatrične klinike v Ljubljani pri eno leto starem dečku Urbanu potrdili okvaro v genu CTNNB1, sta njegova straša stopila v stik z nami in dejala, da bi rada dečku omogočila, da bi prejel gensko terapijo. Kljub temu, da ta takrat ne le, da ta ni obstajala, bilo ni niti predkliničnih študij, v katerih bi takšno terapijo preskušali, sta bila odločena, da bosta naredila vse, da bi do takega zdravljenja prišel. S staršema smo najprej poskušali najti partnerje v Sloveniji in tujini, ki bi jih tak razvoj zanimal. V Sloveniji smo našli ključnega partnerje v raziskovalni skupini prof. dr. Romana Jerale na Kemijskem inštitutu, v tujini pa v raziskovalni skupini izr. prof. dr. Leszka Lisowskega iz Inštituta za medicinske raziskave otrok, CMRI (ang. Children's Medical Research Institute), v Avstraliji. Starša sta ustanovila fundacijo CTNNB1 (<https://ctnnb1-foundation.org/>), znotraj katere sta začela zbirati sredstva prve korake predkliničnih raziskav. Skupina prof. Lisowskega je pričela z razvojem genske nadomestne terapije na Urbanovih celicah, medtem, ko je skupina prof. Jerale pričela z iskanjem alternativnih poti zdravljenja preko povečanja proizvodnje β -katenina preko zdravega alela in zmanjšanjem razgradnje te beljakovine, pri čemer uporabljajo več tehnologij, med drugim tudi protismiselne nukleotide in siRNA. V okviru KOOMRN smo izpeljali veliko študijo, h kateri smo povabili vse znane bolnike s CTNNB1 sindromom v svetu, da bi bolje razumeli povezavo med genskimi spremembami in klinično sliko bolezni (<https://clinicaltrials.gov/>; NCT04812119), tako pa bi bolje razumeli katere težave so pri teh bolnikih v ospredju in na katere dele osrednjega živčevja morajo potencialna nova zdravila sploh ciljati. Istočasno smo pridobili raziskovalni projekt pri Javni agenciji za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS; J7-4537), s čimer smo zmanjšali

finančno breme staršev pri razvoju zdravila v katerem sodelujemo zdravniki, raziskovalci in združenje bolnikov – sodelovanje je ključen pogoj za uspeh pri razvoju novih zdravljenj.

Ker so prvi rezultati zelo vzpodbudni, smo pričeli prva kandidatna zdravila že preverjati v predkliničnih študijah, da bi ugotovili, katere različice zdravil so najbolj varne in učinkovite, kako se zdravilo porazporedi po telesu, kako se pri zdravljenih miših bolezen omili in kakšna je toksikološka karakterizacija zdravil glede na različne doze (Jackson Laboratory; <https://www.jax.org/> in Charles River Laboratories; <https://www.criver.com>). Zdi se, da izbrani vektorji na mišjem modelu povečajo izražanje β -katenina v določenih strukturah osrednjega živčevja.

Ti rezultati so vzpodbudni in zato se lahko aktivnos dogovarjamo za naslednjo fazo, izdelavo zdravila po najvišjih kakovostnih standardih (certifikat Good manufacturing practice, GMP), kar zagotavlja prehod v klinično študijo I/II. V procesu bomo del zdravila poravnili za toksikološke študije, ki so nujno potrebne za odobritev s strani regulatorjev in prvo zdravljenje človeka. Istočasno se z Evropsko agencijo za zdravila (EMA; <https://www.ema.europa.eu/>) že pogovarjamo, kako bi lahko najbolj učinkovito in varno različico zdravila pripeljali do tega, da bi jo lahko uporabili na bolnikih (glej sliko 2).



Slika 2. Shematski prikaz korakov v razvoju genskega nadomestnega zdravljenja za sindrom CTNNB1. Kodirajoče zaporedje za CTNNB1 spojimo z različnimi promotori, ki omogočajo izražanje gena v določenih tipih celic in v telesu bolnika spodbujajo nastajanje β -katenina. Genski material zapakiramo v spremenjen virus (rekombinantni z adenovirusom povezani virus), ki se sam ne more razmnoževati, lahko pa uspešno v bolnikove celice vnese zdrav gen CTNNB1. Različice genskih zdravil preizkusimo na bolnikovih celicah in tkivih, ki jih pridobimo iz celic pacienta in so podobna možganom (možganski organoidi), kasneje pa omejeno število najboljših različic še na mišjem modelu. Najboljše kandidatno zdravilo, če uspemo dokazati njegovo varnost in učinkovitost, nato lahko uporabimo z zdravljenje bolnika.

Kako do zdravila za redko bolezen

Vsaka pot do zdravila za določeno redko bolezen je edinstvena, praviloma pa so vse poti kompleksne, dolgotrajne in drage. Hkrati na začetku poti nimamo nobenega zagotovila, da bo zdravilo na koncu dejansko uspešno – to lahko pokaže šele dejansko zdravljenje bolnikov. Zavedati se moramo, da ima vsaka genska bolezen svoje specifične lastnosti in da mora biti pristop k zdravljenju prilagojen karakteristikam bolezni. Nekatere uspešne strategije, ki so se izkazale pri

določenih boleznih, lahko uporabimo tudi pri drugih, a brez natančnega razumevanja biološke osnove vsake bolezni posebej je nemogoče začeti razvijati zdravilo.

Preden pa se sploh lotimo iskanja zdravila za redko bolezen, moramo zagotoviti nekaj ključnih korakov:

Natančno je potrebno razumeti bolezen na nivoju bolnika: kaj bolezen določa, kateri klinični znaki so najpogostejši, kateri najbolj omejujejo življenje bolnika, kako so genske spremembe na dotičnem genu povezane s klinično sliko bolezni

Natančno je potrebno razumeti bolezen na molekularnem nivoju: kakšen je molekularni mehanizem bolezni, kateri celični elementi so okvarjeni, katere celične poti so okrnjene, katere celice/tkiva/organi so najbolj prizadeti

Izbira prave tehnologije: s pomočjo katere tehnologije bomo najlažje vplivali na bolezenski proces in ga preobrnil v korist bolnika, katera zdravila uspešno dostopajo do prizadetih celic/tkiv/organov, ali lahko z uporabo določene tehnologije rešimo osnovno težavo, ne da bi škodili bolniku na drugem nivoju

Razviti je potrebno relevantne celične in živalske modele: pri mišjih modelih je potrebno z opazovalno študijo naravne zgodovine bolezni opredeliti in ugotoviti, kako relevanten je model pri dotični bolezni, preden se na teh modelih zdravilo testira

Testiranje kandidatnih zdravil za učinkovitost in varnost: na celicah, tkivih, živalskih modelih testiramo, katera zdravila so bolj/manj varna, kako se zdravilo porazporedi po telesu, ali je zdravilni učinek trajen/začasen

Produkcija izbranega kandidatnega zdravila za klinično testiranje in nadzor kakovosti: naloga nadzora kakovosti je zagotoviti, da je vsaka genska terapija, ki se uporabi pri bolniku, varna, učinkovita in ustreza vnaprej določenim zahtevam

Pridobiti soglasja vseh javnih agencij, ki skrbijo za varnost bolnikov: pridobitev mnenja Komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije, Javne agencije Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP), Evropske agencije za zdravila (EMA), itd.

Prva aplikacija bolniku: tej sledi zelo natančno spremljanje stanja bolnika, ugotavljanje uspešnosti zdravljenja in beleženje vseh potencialnih stranskih učinkov zdravila

Zaključek

Področje redkih bolezni doživlja neverjeten razmah in kljub temu, da so zgodbe o uspešnem zdravljenju genskih bolezni še redke, postajajo vse pogostejše. Tudi pri bolnikih, za katerih bolezni zdravila še ne obstajajo, je mogoče s simptomatskim zdravljenjem in multidisciplinarno obravnavo »kupovati čas«, v katerem bo morda vzročno zdravilo za dotično gensko bolezen razvito. V Sloveniji so na razpolago številne možnosti za takojšnje simptomatsko zdravljenje, ki so bolnikom relativno lahko dostopne, pomembno pa je dobro sodelovanje z lečečimi zdravniki, ki temelji na obojestranskem zaupanju. Hkrati pa imamo tudi v Sloveniji možnosti, da razvijamo najnaprednejše pristope k zdravljenju, s čimer se postavljamo ob bok najrazvitejšim državam na svetu. Tako bomo lahko pomagali ne le slovenskim bolnikom z redkimi boleznimi, temveč tudi tistim po svetu.

Financiranje

Sodelovanje med zdravniki, raziskovalci in organizacijo pacientov za CTNNB1 je podprto preko projekta ARRS J7-4537.

Viri:

1. de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BWM, et al. Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *N Engl J Med*. 2012;367(20):1921-1929. doi:10.1056/NEJMOA1206524
2. Moreno-De-Luca A, Millan F, Pesacreta DR, et al. Molecular Diagnostic Yield of Exome Sequencing in Patients With Cerebral Palsy. *JAMA*. 2021;325(5):467-475. doi:10.1001/JAMA.2020.26148
3. Dubruc E, Putoux A, Labalme A, Rougeot C, Sanlaville D, Edery P. A new intellectual disability syndrome caused by CTNNB1 haploinsufficiency. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(6):1571-1575. doi:10.1002/AJMG.A.36484
4. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J*. 2012;31(12):2714-2736. doi:10.1038/EMBOJ.2012.150
5. Bian J, Dannappel M, Wan C, Firestein R. Transcriptional Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway in Colorectal Cancer. *Cells*. 2020;9(9). doi:10.3390/CELLS9092125
6. Tucci V, Kleefstra T, Hardy A, et al. Dominant β -catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1468-1482. doi:10.1172/JCI70372
7. Tucci V, Kleefstra T, Hardy A, et al. Dominant β -catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *J Clin Invest*. 2014;124(4):1468-1482. doi:10.1172/JCI70372
8. Kuechler A, Willemsen MH, Albrecht B, et al. De novo mutations in beta-catenin (CTNNB1) appear to be a frequent cause of intellectual disability: expanding the mutational and clinical spectrum. *Hum Genet*. 2015;134(1):97-109. doi:10.1007/S00439-014-1498-1
9. Mirošević Š, Khandelwal S, Sušjan P, et al. Correlation between Phenotype and Genotype in CTNNB1 Syndrome: A Systematic Review of the Literature. *Int J Mol Sci*. 2022;23(20). doi:10.3390/IJMS232012564

Genetski vzroki hipertrofične kardiomiopatije v slovenski populaciji

Nina Vodnjov^{1,2}, Aleš Maver^{1,3}, Janez Toplišek⁴, Borut Peterlin^{1,3}, Karin Writzl^{1,3}

¹ Univerzitetni Klinični Center Ljubljana, Klinični inštitut za genomsko medicino, Štajmerjeva 4, 1000, Ljubljana, Slovenija

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Univerzitetni Klinični Center Ljubljana, Klinični oddelek za kardiologijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

Uvod:

Hipertrofična kardiomiopatija (HKM) je najpogostejša podedovana bolezen srca, katere prevalenca v populaciji je ocenjena na 1:200 [1]. Bolezen se odraža z zadebelitvijo stene levega prekata srca, ki je ne moremo pojasniti z drugimi vzroki in se razvije kot posledica genetskih in okoljskih dejavnikov [2]. Penetranca bolezni ni popolna in se fenotipsko izraža zelo različno [3]. Vzročne različice se pogosto nahajajo v sarkomernih genih in sicer se jih 40-45% nahaja v MYBPC3, 15-25% v MYH7, 1-7% v TNNI3 in TNNT2, ter 1-2% v TPM1, ACTC, MYL2 in MYL3. Različice v ostalih genih, izraženih v srčni mišici, predstavljajo manj kot 1% genetske etiologije bolezni [4]. Genetski vzrok pri več kot polovici preiskovancev ostane nepojasnen [3]. Molekularna patologija HKM je povezana tudi s populacijskim izvorom posameznika in se svetovnih populacijah razlikuje [5]. Namen raziskave je bilo opredeliti nabor in frekvenco vzročnih genetskih različic pri preiskovancih z napotno diagnozo HKM v slovenski populaciji ter oceniti delež izplena genetskega testiranja.

Metode:

Na Kliničnem inštitutu za genomsko medicino (KIGM) smo v letih od januarja 2010 do avgusta 2023 genetsko testirali 204 preiskovancev (126 moških in 78 žensk) z napotno diagnozo HKM. Med preiskovanci je bilo 195 (95,6%) državljanov Republike Slovenije (RS) in 9 (4,4%) državljanov Srbije, Črne Gore oz. Bolgarije. Raziskavo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko (0120-71/2022/3) in je bila narejena v skladu s Helsinško deklaracijo. Raziskava je temeljila na obdelavi rezultatov genetskih testiranj preiskovancev, pridobljenih med rutinsko obravnavo.

Rezultati:

Pri 69 (33,8%) preiskovancih smo ugotovili prisotnost vzročne različice. Pri 135 (66,2%) preiskovancih genetskega vzroka bolezni nismo uspeli opredeliti; pri slednjih smo pri 58 (43,0%) ugotovili prisotnost ene ali več različic nejasnega pomena. Ugotovili smo 39 vzročnih različic v 11 genih. V MYBPC3 smo jih ugotovili 21, v MYH7 devet, v MYL2 dve in po eno v genih FHOD3, TPM1, ALPK3, GLA, PRKAG2, TNNT2, TNNI3 in PLN. Vzročno različico v MYBPC3 smo ugotovili pri 41 (59,4%) preiskovancih, v MYH7 pri devetih (13,0%), v FHOD3 pri osmih (11,6%), v MYL2, TPM1 in ALPK3 pri dveh (2,9%) ter v GLA, PRKAG2, TNNT2, TNNI3 in PLN pri enem (1,4%). Sedem vzročnih različic smo ugotovili pri dveh ali več preiskovancih in sicer smo MYBPC3:c.913_914del ugotovili pri 18 preiskovancih, FHOD3:c.1646+2T>C pri osmih in MYBPC3:c.26-2A>G, MYBPC3:c.1806del, MYBPC3:c.772+1G>A, TPM1:c.649G>A, ALPK3:c.432_435dup pri dveh. Pri eni preiskovanki smo ugotovili prisotnost dveh vzročnih različic

in sicer c.26-2A>G in c.913_914del v MYBPC3. Pri šestih preiskovancih smo poleg vzročne različice ugotovili še prisotnost različice nejasnega pomena.

Diskusija:

V kohorti preiskovancev s sumom na genetsko etiologijo HKM smo genetski vzrok ugotovili pri tretjini preiskovancev. Delež izplena genetskega testiranja je skladen s podatki iz literature [3]. Večino genetske etiologije HKM v slovenski populaciji smo pojasnili z različicami v genih MYBPC3 (59,4%) in MYH7 (13,0%), kar je skladno s podatki iz literature. Tretji najpogostejši vzrok predstavlja različica v FHOD3, s katero smo pojasnili več kot 10% slovenske genetske etiologije HKM, kar je znatno več od dosedanjih poročanj (0,5-2%). Razlog za odstopanje lahko predstavlja dejstvo, da so FHOD3 s HKM povezali pred nedavnim in je bil v testni panel genov dodan šele leta 2022, zato ga predhodne študije, temelječe na panelih, niso vključevale [4]. Z dvema različicama, c.913_914del v MYBPC3 in c.1646+2T>C v FHOD3, smo pojasnili več kot tretjino (38,7%) slovenske genetske etiologije HKM. MYBPC3:c.913_914del predstavlja pogosto, za HKM vzročno, različico na območju severne Italije [6], medtem ko različica FHOD3:c.1646+2T>C predhodno še ni bila opisana v literaturi. Analiza haplotipa in rodovnikov preiskovancev je pokazala, da različica izvira iz skupnega prednika, ki je živel na Balkanskem polotoku.

Zaključek:

Zaključujemo, da smo na KIGM genetski vzrok HKM opredelili pri tretjini preiskovancev. V primerjavi z ostalim populacijami, v slovenski višji delež genetske etiologije HKM pojasnimo s spremembami v FHOD3. Poznavanje genetskega ozadja HKM v lokalni populaciji nam omogoča višji izplen genetskega testiranja.

Viri:

1. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, Maron BJ. *New Perspectives on the Prevalence of Hypertrophic Cardiomyopathy*. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65:1249–54.
2. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases*. *European Heart Journal*. 2007;29:270–6.
3. Maron BA, Wang R-S, Carnethon MR, Rowin EJ, Loscalzo J, Maron BJ, et al. *What Causes Hypertrophic Cardiomyopathy? The American Journal of Cardiology*. 2022;179:74–82.
4. Wilde AAM, Semsarian C, Márquez MF, Sepeshri Shamloo A, Ackerman MJ, Ashley EA, et al. *European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases*. *Journal of Arrhythmia*. 2022;38:491–553.
5. Mazzarotto F, Olivotto I, Boschi B, Girolami F, Poggesi C, Barton PJR, et al. *Contemporary Insights Into the Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy: Toward a New Era in Clinical Testing?* *JAHA*. 2020;9:e015473.
6. Calore C, De Bortoli M, Romualdi C, Lorenzon A, Angelini A, Basso C, et al. *A founder MYBPC3 mutation results in HCM with a high risk of sudden death after the fourth decade of life*. *J Med Genet*. 2015;52:338–47.

Diagnostika redkih bolezni preko univerzalnega nacionalnega programa presejanja na celokupni holesterol pri predšolskih otrocih

Urša Šuštar^{1,2}, Tinka Hovnik^{2,3}, Matej Mlinarič¹, Katarina Trebušak Podkrajšek^{2,3}, Jernej Kovač^{2,3}, Tadej Battelino^{1,3}, Urh Grošelj^{1,3}

1 Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

2 Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

3 Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Družinska hiperholesterolemija je najpogostejša genetska motnja presnove lipidov, za katero so značilne povišane vrednosti holesterola že pri majhnih otrocih. Vodi do prezgodnjega razvoja srčno-žilnih bolezni. V Sloveniji imamo vzpostavljen nacionalni program presejanja na holesterol pri predšolskih otrocih. Otroci s povišanimi vrednostmi holesterola so nato napoteni na Pediatrično kliniko UKC Ljubljana na genetsko diagnostiko. Od l. 2018 naprej so na diagnostični genetski panel uvrščeni tudi geni, ki so povezani z redkimi dislipidemijami, saj hiperholesterolemija lahko nastane tudi kot posledica redkih genetskih variant v drugih genih, povezanih z metabolizmom holesterola.

Preko univerzalnega nacionalnega programa presejanja na celokupni holesterol smo diagnosticirali 3 otroke, ki so imeli homozigotno varianto v genu LIPA, ki zapisuje za lizosomsko lislo lipazo (LAL). Lizosomska kislina lipaza je encim, ki razgrajuje holesteril estere (CE) in trigliceride (TG) v maščobne kisline in prosti holesterol. Genetska varianta v genu LIPA vodi do pomanjkanja encima LAL (LAL-D), kar privede do nalaganja CE in TG v lizosomih. Glede na genetsko varianto in posledično na rezidualno aktivnost lizosomske kisline lipaze, se LAL-D manifestira kot zelo resna in letalna Wolmanova bolezen ali pa kot motnja shranjevanja holesteril estrov (CESD), ki je blažja oblika z milejšim fenotipom. Pri CESD so prisotni različni simptomi, ki se običajno začnejo v otroštvu, lahko pa se razvijajo tudi kasneje v odrasli dobi. Vsi trije preiskovanci iz naše populacije so imeli pomembno zvišanje transaminaz, zmanjšano aktivnost lizosomske kisline lipaze ter povečana jetra. Ker smo jih odkrili dovolj zgodaj, smo jih lahko začeli zdraviti pred razvojem dodatnih zapletov, povezanih s CESD.

Odkrivanje vzrokov za prirojeno eritrocitozo pri slovenskih bolnikih

Aleša Kristan¹, Aleš Maver², Tadej Pajič², Irena Preložnik Zupan³, Saša Anžej Doma³, Špela Žula³, Rok Količ⁴, Andrej Vuga⁴, Petra Hudler¹, Tadeja Režen¹, Jure Stojan¹, Tanja Kunej³, Nataša Debeljak¹

¹Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija;

²Klinični inštitut za genomsko medicino, Univerzitetni klinični center, Ljubljana, Slovenija;

³Oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija;

⁴Oddelek za hematologijo, Univerzitetni klinični center, Ljubljana, Slovenija; ⁵Kemomed raziskave in razvoj, Kemomed, Ljubljana, Slovenija; ⁶Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Domžale, Slovenija.

Uvod in namen:

Eritrocitoza je bolezensko stanje, pri katerem pride do povečanega števila eritrocitov, kar sovпада s povišanimi vrednostmi hemoglobina in/ali hematokrita v krvni sliki. Najpogostejši vzroki za eritrocitozo so pridobljeni, medtem ko je prirojena eritrocitoza redka oblika z znanimi vzroki v devetih različnih genih (EPOR, VHL, EGLN1, EPAS1, EPO, HBB, HBA1, HBA2 in BPGM), ki povzročajo osem različnih tipov prirojene eritrocitoze (ECYT 1-8) [1]. Molekularno-genetska diagnostika prirojene eritrocitoze v Sloveniji do sedaj še ni bila uveljavljena, zato je veliko bolnikov s sumom na prirojeno eritrocitozo ostalo brez potrjenega genetskega vzroka in v nekaterih primerih so bili tudi neustrezno zdravljeni. Namen raziskave je bil poiskati genetski vzrok, povezan z razvojem eritrocitoze, pri slovenskih bolnikih, pri katerih obstaja sum na prirojeno eritrocitozo. Prav tako smo želeli ovrednotiti vpliv odkrite nove genetske različice na razvoj eritrocitoze.

Metode:

Z novo vzpostavljenim nacionalnim diagnostičnim algoritmom [2] je bilo opredeljenih 28 bolnikov s simptomi prirojene eritrocitoze, ki so bili vključeni v raziskavo, vključno s tremi družinami z dvema zdravima družinskimi članoma. Za molekularno-genetsko diagnostiko smo uporabili tarčno sekvenciranje naslednje generacije (NGS), v katerega smo vključili 39 izbranih genov vključenih v molekularno pot eritropoeze in metabolizma železa. Identificirane različice so bile potrjene s sekvenciranjem po Sangerju. Izbrana nova genetska različica je bila nadalje funkcionalno opredeljena z lokalizacijo različice na 3D strukturi proteina, analizo izražanja proteina s kvantitativnim prenosom western in analizo aktivnosti proteina z uporabo luciferaznega poročevalskega testa.

Rezultati:

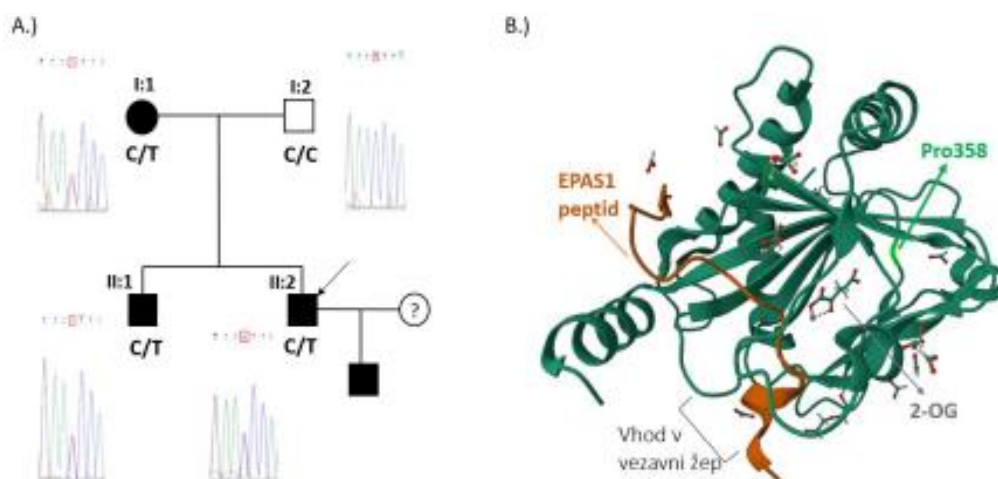
S tarčnim NGS 28-ih bolnikov smo odkrili eno znano patogeno različico v genu EPAS1, c.1609G>A (p.(Gly537Arg)), in štiri različice neznanega pomena (ang. variant of unknown significance, VUS) v genih EGLN1, JAK2, EPAS1 in SH2B3 (Tabela 1) [3].

Tabela 1: Patogene različice in različice neznanega pomena pri slovenskih bolnikih z eritrocitozo[3].

Tabela 1: Patogene različice in različice neznanega pomena pri slovenskih bolnikih z eritrocitozo [3].

Gen	Sprememba nukleotida (RefSeq)	Sprememba aminokisliline	Številka Rs	Frekvenca alela	<i>In silico</i> orodja s patogenimi predikcijami	Klasifikacija
<i>EPAS1</i>	1609G>A (NM_001430.5)	p.(Gly537Arg)	rs137853036	NA	18/22	Patogena
<i>JAK2</i>	c.1767C>A (NM_004972.3)	p.(Asn589Lys)	rs1362123436	0.000004044	12/22	VUS
<i>EGLN1</i>	c.1072C>T (NM_022051.2)	p.(Pro358Ser)	NA	NA	17/25	VUS
<i>EPAS1</i>	c.2120A>C (NM_001430.5)	p.(Lys707Thr)	rs950180639	NA	12/21	VUS
<i>SH2B3</i>	c.901G>A (NM_005475.3)	p.(Glu301Lys)	rs374278232	0.00003896	15/21	VUS

V eni družini smo ugotovili tudi dve različici z nizko frekvenco v populaciji (< 5 %), v genih *EGLN1* in *JAK2* [4]. Poleg tega smo opazili visoko pojavnost prenašalcev patogenih različic v genu *HFE* [3]. Različica c.1072C>T (p.(Pro358Ser)) v genu *EGLN1* je ko-segregirala z boleznijo pri več družinskih članih (Slika 1A), imela je visoko napoved patogenosti ter ni bila opisana v literaturi in klinični zbirki podatkov, zato je bila izbrana za dodatne funkcionalne analize. Lokalizacija na 3D strukturi proteina je pokazala, da se različica nahaja v aktivnem centru proteina in lahko vpliva na njegovo aktivnost (Slika 1B). Rezultati kvantitativnega prenosa western so pokazali statistično pomembno ($P < 0,0001$) zmanjšano izražanje proteina *EGLN1* z različico c.1072C>T (p.(Pro358Ser)), v primerjavi z nativnim proteinom. Oba rezultata nakazujeta na zmanjšano aktivnost *EGLN1*. Z luciferaznim poročevalskim testom nismo potrdili vpliva različice c.1072C>T (p.(Pro358Ser)) na zmanjšano aktivnost *EGLN1*.



Slika 1: Različica c.1072C>T (p.(Pro358Ser)) v genu *EGLN1*, identificirana pri eni družini. A.)

Družinsko drevo z odseki sekvenciranja po Sangerju na mestu različice. B.) Lokalizacija aminokisliline Pro358 v aktivnem centru hidrosilaze *EGLN1*.

Zaključki: S tarčnim NGS smo uspešno potrdili genetski vzrok za eritrocitozo pri enem bolniku, prvem slovenskem bolniku s prirojeno eritrocitozo (ECYT4). Poleg tega smo identificirali štiri VUS v genih EGLN1, JAK2, EPAS1 in SH2B3, pri tem smo VUS v genu EGLN1 izbrali za nadaljnjo funkcionalno opredelitev. Rezultati funkcionalnih analiz so pokazali lokacijo različice v aktivnem mestu proteina EGLN1 in vpliv na izražanje proteina, ne pa tudi na aktivnost. Za opredelitev vpliva različice na delovanje proteina in nadaljnjo uravnavanje izražanja s hipoksijo inducibilnih tarčnih genov so potrebne dodatne analize.

Viri:

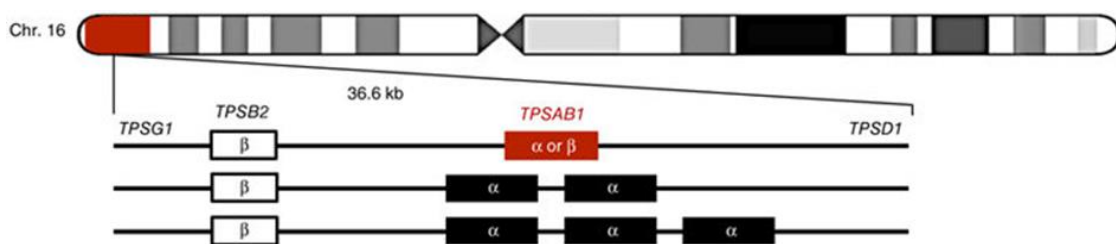
1. McMullin MF. *Genetic Background of Congenital Erythrocytosis. Genes (Basel).* 2021;12(8).
2. Anzej Doma S, Drnovsek E, Kristan A, Fink M, Sever M, Podgornik H, et al. *Diagnosis and management of non-clonal erythrocytosis remains challenging: a single centre clinical experience. Ann Hematol.* 2021.
3. Kristan A, Pajic T, Maver A, Rezen T, Kunej T, Kolic R, et al. *Identification of Variants Associated With Rare Hematological Disorder Erythrocytosis Using Targeted Next-Generation Sequencing Analysis. Front Genet.* 2021;12:689868.
4. Kristan A, Gaspersic J, Rezen T, Kunej T, Kolic R, Vuga A, et al. *Genetic analysis of 39 erythrocytosis and hereditary hemochromatosis-associated genes in the Slovenian family with idiopathic erythrocytosis. J Clin Lab Anal.* 2021:e23715.

Dedna alfa-triptazemija

Matija Rijavec, Manca Svetina, Nina Rupar, Julij Šelb, Peter Kopač, Mitja Košnik, Peter Korošec
Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik

Dedna α -triptazemija (H α T, angl. hereditary alpha tryptasemia) je genetska lastnost, ki je posledica presežnih kopij gena TPSAB1, ki kodira α -triptazo, kar vodi do povišane koncentracije bazalne triptaze v serumu. Dedovanje je avtosomno dominantno, s popolno penetranco, tako da imajo skoraj vse osebe s H α T povišano koncentracijo bazalne triptaze (običajno nad 8 ng/mL). H α T je prisotna v 4-7 % splošne populacije, in tako predstavlja najpogostejši vzrok za povišano koncentracijo bazalne triptaze v serumu, saj je H α T prisoten pri ~90 % posameznikov iz splošne populacije s povišano bazalno triptazo. Simptomi H α T so raznoliki in dokaj nespecifični, veliko oseb s H α T je tudi brez kakršnihkoli simptomov. Najpogostejši simptomi pri H α T so kronična srbečica/rdečica, gastrointestinalne težave, ohranjena primarna denticija, sistemska reakcija (anafilaksija) po pikih kožekrilcev in mastocitoza. Številne raziskave so potrdile, da je H α T pomemben dejavnik tveganja predvsem za sistemska reakcija po pikih kožekrilcev in mastocitozo.

Genetika človeškega triptaznega lokusa je kompleksna. Lokus je sestavljen iz štirih paralognih genov (TPSG1: γ -triptaza, TPSB2: β 2-3-triptaza, TPSAB1: α / β 1-triptaza in TPSD1: δ -triptaza), ki se nahajajo v nestabilni subteločni regiji (p13.3) kromosoma 16 (Slika 1). Čeprav vsi ti geni kodirajo triptaze, samo gena TPSB2 in TPSAB1 kodirata štiri glavne izomerne oblike (β 1 (β), β 2, β 3 in α), ki predstavljajo glavno, biološko pomembno triptazo, ki jo običajno merimo kot triptazo v serumu. Gen TPSB2 kodira samo β -triptazo, medtem ko TPSAB1 nosi zapis bodisi za izoobliko α ali β . Ker so posamezne izooblike izjemno podobne (več kot 97 % podobnost), je razlikovanje med različnimi izooblikami izjemno težavno.



Slika 1: Grafični prikaz triptaznega lokusa na kromosomu 16p13.3.

Najpogostejši genotipi TPSAB1 so α/α , α/β in β/β , medtem ko sta na TPSB2 prisotni dve dodatni kopiji β -triptaze. Posamezniki z genotipom $2\alpha:2\beta$ ($\alpha,\beta/\alpha,\beta$) imajo dve kopiji α -triptaze na nasprotnih alelih (po ena kopija podedovana od vsakega starša), kar ne predstavlja povečanega števila kopij TPSAB1. Približno 5 % oseb pa podeduje dodatne kopije zaporedij, ki kodirajo α -triptazo na istem alelu (duplikacija ($\alpha\alpha$), triplikacija ($\alpha\alpha\alpha$)), kar privede do povišane bazalne triptaze v serumu in H α T. Zaradi zapletene genetske strukture, prisotnosti zaporedij z visokim deležem GC, in velike podobnosti med zaporedji, ki kodirajo izooblike α -triptaze in β -triptaze, ter prisotnosti več paralogov na enem lokusu, je natančna določitev števila kopij posamezne izooblike na triptaznem

lokusu tehnično zahtevna. Zaradi te strukturne kompleksnosti in podobnosti zaporedij je sekvenciranje nove generacije (angl. next-generation sequencing, NGS) omenjenega lokusa težavno, podobno kot tudi razlikovanje med različnimi izooblikami triptaz na proteinski ravni. Kot rešitev za zahtevno genotipizacijo triptaznega lokusa so Lyons in sodelavci razvili metodo, ki s pomočjo digitalnega kapljičnega PCR (ddPCR, angl. Digital Droplet PCR), omogoča natančno določitev števila kopij gena TPSAB1. Z omenjeno metodo tudi v Laboratoriju za klinično imunologijo in molekularno genetiko Klinike Golnik s pomočjo ddPCR QX200 (Bio-Rad) direktno kvantificiramo število kopij α -triptaze in β -triptaze s pomočjo specifičnih oligonukleotidov in sond za α - in β -triptazo. Omenjene sonde ne hibridizirajo na γ - oziroma δ -triptazo- genov TPSG1 oziroma TPSD1.

DNA predhodno tretiramo z restrikcijsko endonukleazo, kot referenčni gen pa uporabljamo AP3B1 oz. AGO1. Čeprav ima tudi omenjena metoda še vedno pomanjkljivosti in je v določenih primerih za natančno določitev genotipa, potrebna tudi genotipizacija triptaznega lokusa pri starših, se je le-ta izkazala kot uporabna.

Viri:

1. Lyons JJ, Yu X, Hughes JD, Le QT, Jamil A, Bai Y, et al. Elevated basal serum tryptase identifies a multisystem disorder associated with increased TPSAB1 copy number. *Nat Genet.* 2016;48(12):1564–9.

2. Lyons JJ, Chovanec J, O'Connell MP, Liu Y, Šelb J, Zanotti R, et al. Heritable risk for severe anaphylaxis associated with increased α -tryptase-encoding germline copy number at TPSAB1. *J Allergy Clin Immunol.* 2021;147(2):622–32.

3. Glover SC, Carter MC, Korošec P, Bonadonna P, Schwartz LB, Milner JD, et al. Clinical relevance of inherited genetic differences in human tryptases. *Ann Allergy, Asthma Immunol.* 2021;127(6):638–47.

4. Košnik M, Rijavec M, Šelb J, Korošec P. Genetski razlogi za anafilaksijo. In: Fras Z, Košnik M, ur. *Izbrana poglavja iz interne medicine 2021: univerziteni učbenik.* Ljubljana : Medicinska fakulteta, Katedra za interno medicino: Slovensko zdravniško društvo, 2021. p. 169-177.

5. Šelb J, Rijavec M, Kopač P, Lyons JJ, Korošec P. HaT is associated with increased risk for severe Hymenoptera venom-triggered anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2023;151(3):804-805.

6. Kačar M, Rijavec M, Šelb J, Korošec P. Clonal mast cell disorders and hereditary α -tryptasemia as risk factors for anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2023;53(4):392-404.

Genetska diagnostika motenj avtističnega spektra z retrospektivno analizo diagnostičnega izplena z vključeno dizmorfološko oceno preiskovancev

Gaber Bergant, Luca Lovrečič, Aleš Maver, Borut Peterlin

UKC Ljubljana, Klinični inštitut za genomsko medicino, Štajmerjeva 4, Ljubljana, Slovenija

Ozadje: Motnja avtističnega spektra (MAS) je kompleksna, večplastna skupina bolezni, katere imajo med drugim lahko tudi genetski vzrok. V opravljeni študiji smo pri bolnikih z MAS retrospektivno analizirali diagnostični izplen različnih metodologij genetskega testiranja, pri čemer smo v analizo vključili tudi rezultate dizmorfološke ocene preiskovancev z namenom ugotoviti pomen pridruženih znakov na diagnostični uspeh posameznih metod.

Metode: Študija je zajela 631 preiskovancev, pri katerih so bili izvedeni različni genetski testi – tarčna analiza gena FMR1 (FraX), komparativna genomska hibridizacija (aCGH) in sekvenciranje naslednje generacije (NGS). Glede na prisotnost kongenitalnih nepravilnosti notranjih organov in dizmorfološko oceno smo jih razvrstili v tri kategorije: esencialna, zmerne in kompleksna MAS. Zbrane podatke smo uporabili za analizo korelacije med kompleksnostjo MAS in diagnostičnim donosom.

Rezultati: Za 431 preiskovancev smo zbrali minimalne zahtevane podatke ter jih vključili v nadaljno analizo. Med preiskovanci je bil skupni diagnostični izplen 8,8 %. Razčlenitev preiskovancev glede na kompleksnost klinične slike je razkrila 396 primerov esencialne, 18 zmerne in 17 kompleksne oblike MAS, diagnostični izplen pa je v istem zaporedju znašal 7,3%, 27,8% in 23,5%. Diagnostični izplen posameznih molekularnih metod je znašal 3,4% (FraX), 7,1% (aCGH) in 6,6% (NGS).

Zaključek: Retrospektivna analiza je pokazala, da bi uporaba dismorfološkega rezultata lahko ločila bolnike na podlagi verjetnosti genetskega vzroka za MAS. Uvedba dizmorfološke ocene v diagnostični proces bi se lahko izkazala za ključno pri izboljšanju učinkovitosti poti genetskega testiranja za bolnike z MAS, kar bi lahko vodilo v bolj ciljno usmerjene in učinkovitejše diagnostične strategije. Poleg tega smo tudi potrdili, da je diagnostični izplen na našem inštitutu primerljiv z rezultati drugih centrov v kontekstu diagnostike bolnikov z MAS. Dodatne raziskave bi lahko vodile v optimizacijo diagnostičnih poti glede na kompleksnost klinične prezentacije MAS.

Ključne besede: Motnja avtističnega spektra, genetska diagnostika, sekvenciranje naslednje generacije, komparativna genomska hibridizacija, diagnostični izplen.

Urejenost sladkorne bolezni tipa 1 in DNA metilacija

Barbara Čugalj Kern ^{1,2}, Jernej Kovač ^{1,2}, Robert Šket ¹, Barbara Jenko Bizjan ^{1,2}, Tine Tesovnik ¹, Klemen Dovč ^{1,2}, Tadej Battelino ^{1,2}, in Nataša Bratina ^{1,2}

¹ Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Uravnavanje sladkorne bolezni tipa 1 (SB1) je pomembno, da preprečimo mikro- in makrovaskularne zaplete, kot so diabetična retinopatija, kronična ledvična odpoved, nevropatija, srčno-žilna obolenja in poslabšanja sluha. Vedno več je dokazov, da dolgotrajna hiperglikemija preko metilacijskih vzorcev DNA vpliva na razvoj žilnih zapletov.

Namen naše raziskave je ugotoviti vpliv urejenosti sladkorne bolezni tipa 1 na metilacijo DNA v krvnih vzorcih pri preiskovancih s sladkorno boleznijo tipa 1 brez kliničnih znakov poznih zapletov, zato smo izvedli primerjalno analizo med preiskovanci s SB1, ki imajo optimalno in suboptimalno uravnavanje SB1.

V raziskavo smo vključili 20 preiskovancev s SB1, starih med 13 in 21 let in trajanjem SB1 vsaj 5 let. DNA preiskovancev smo izolirali iz celotne krvi in jo združili glede na povprečne vrednosti glikiranega hemoglobina (HbA1c). Preiskovanci so bili razdeljeni v dve skupini: HbA1c < 7% (10 preiskovancev) in HbA1c ≥ 8% (10 preiskovancev). DNA metilacijo smo določili s platformo PromethION (Oxford Nanopore Sequencing), ki omogoča sekvenciranje native DNA v realnem času. Analizo podatkov smo izvedli v programu R. Pri tem smo uporabili sledeče metode: DSS za statistično analizo, annotar za anotacijo genov in clusterProfiler za določitev obogatitev signalnih poti.

Med preiskovanima skupinama smo določili 8385 različno metiliranih CpG pozicij. Od tega je bilo 4575 hipometiliranih in 3810 hipermetiliranih glede na skupino HbA1c ≥ 8%. Te pozicije se nahajajo v 1802 genih, ki so bili obogateni v 48 signalnih poteh.

Naši rezultati nakazujejo, da različno uravnavanje SB1 vpliva na metilacijski profil DNA v krvnih vzorcih preiskovancev s SB1 brez kliničnih znakov poznih zapletov. Večina od statistično značilnih signalnih poti je že bilo povezanih s patologijo vaskularnih zapletov. Spremembe v metilacijske profilu DNA bi lahko prispevale k zgodnji določitvi tveganja za razvoj mikro- in makrovaskularnih zapletov pri SB1.

Dopolnitev eksomskega in genomskega sekvenciranje s sekvenciranjem RNA v diagnostiki monogenских bolezni: prikaz uporabe analize RNA na kliničnih primerih

Barbara Golob*, Tanja Višnjar*, Aleš Maver, Gaber Bergant, Gorazd Rudolf, Ivana Babić Božović, Karin Writzl, Borut Peterlin

** enakovredno prispevali k nastanku tega prispevka in si delita prvo avtorstvo.*

Klinični inštitut za genomsko medicino, Šlajmerjeva 4, SI-1000 Ljubljana

Uvod

Pomanjkanje funkcionalnih dokazov vpliva posameznih genetskih različic na klinično sliko, mnogokrat pušča posameznike s sumom na monogenške bolezni brez dokončne diagnoze. Pogosto se genetske različice, ki vplivajo na alternativno spajanje eksonov izven konservativnega mesta GT-AG, klasificirajo kot različice nejasnega pomena (VUS) ali pa različice zaradi tehničnih ali drugih omejitev ni možno zaznati ter opredeliti na nivoju DNA. Vpeljava analize RNA v klinično diagnostiko monogenških bolezni lahko znatno doprinese k izboljšani obravnavi pacientov, ki so nosilci različic nejasnega pomena (VUS) ali pa kljub jasni klinični sliki ostajajo brez genetskega vzroka. Na treh kliničnih primerih predstavljamo doprinos razširitve metod eksomskega (WES) in genomskega (WGS) sekvenciranja z implementacijo analize RNA.

Rezultati

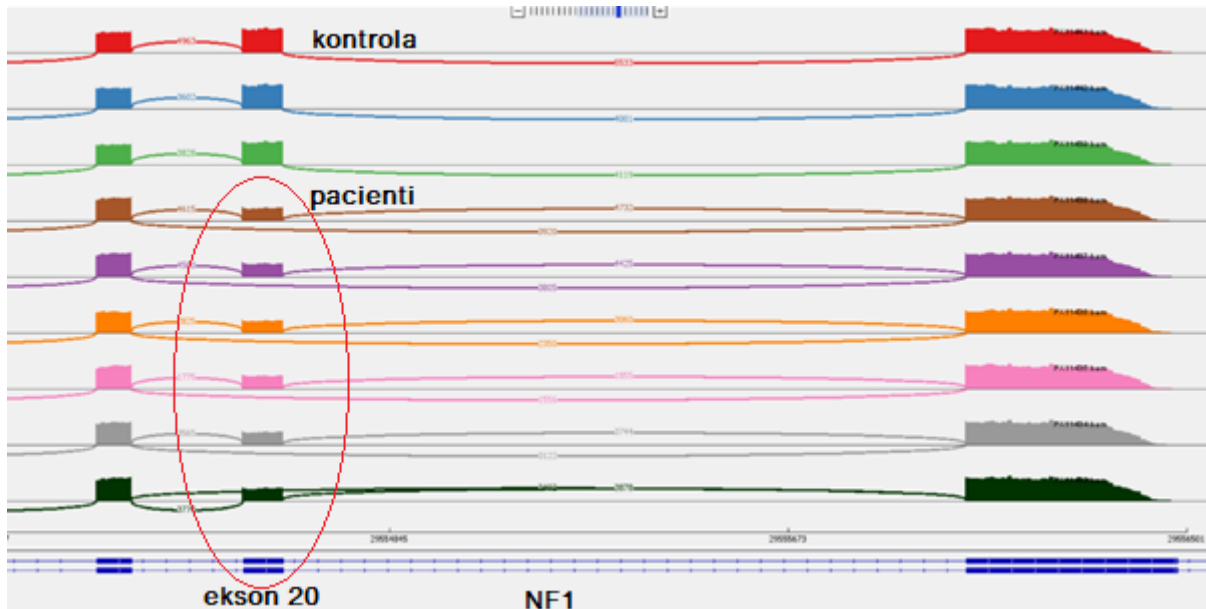
Prvi primer

V genetsko ambulanto je bil napoten enoletni deček s povišanimi vrednostmi encima kreatin kinaze s sumom na Duchennovo mišično distrofijo. Opravljeno klinično eksomsko sekvenciranje (CES) ni pokazalo genetskega vzroka klinične slike, medtem ko je histološki pregled biopsije mišice pokazal nepravilnosti skladne z Duchennovo mišično distrofijo. Zaradi negativnega rezultata CES, se je raziskava razširila na WES, MLPA in WGS. Nobena od genetskih preiskav na DNA izolirani iz periferne krvi ni pokazala patogenih različic v genu DMD. Sledilo je sekvenciranje celokupne RNA (RNAseq) biopsije mišice, ki je pokazalo odsotnost eksonov od eksona 52 naprej, profil branj pa govori v prid intrageneske inverzije v genu DMD. Odsotnost različice v genomskih in drugih sekvenčnih podatkih periferne krvi najverjetneje govori v prid mozaicizma pri preiskovancu, kar je znan pojav DMD genopatij. Z opravljeno analizo RNAseq smo potrdili diagnozo DMD.

Drugi primer

V genetsko ambulanto je bil napoten 13-letni deček s fokalno epilepsijo, zmerno intelektualno manjzmožnostjo, z izrazito vedenjsko simptomatiko, motnjami avtističnega spektra in več kot desetimi Café-au-lait (CAL) madeži na koži. V družinski anamnezi je njegov oče z vsaj 12 CAL madeži na koži in dioptrijo (+6 desno in +2 levo) ter dedek po očetovi strani z več CAL madežev na koži in dvema kožnima spremembama, ki bi glede na opis lahko bila neurofibroma. Leta 2012 je bil pri dečku klinično postavljen sum na neurofibromatozo tipa 1. Istega leta so v Angliji s tarčno analizo gena NF1 ugotovili različico (NM_001042492.3):c.2326-5T>C, ki je bila poročana kot različica nejasnega pomena (VUS). Analiza segregacije je pokazala, da je različica prisotna tako pri očetu kot pri dedku po očetovi strani, vendar je različica po reinterpretaciji ostala klasificirana kot

VUS. Analizi RNA na osnovi PCR in RNAseq sta pokazali, da ima različica (NM_001042492.3):c.2326-5T>C v genu NF1 vpliv na alternativno izrezovanje priležnega eksona 20. Različica je bila po analizi RNA opredeljena kot verjetno patogena različica, kar je omogočilo potrditev klinično postavljene diagnoze NF1 pri nosilcih različice.



Slika1. Shema analize spajanja eksonov na nivoju mRNA gena NF1 je pokazala vpliv različice (NM_001042492.3):c.2326-5T>C na alternativno izrezovanje priležnega eksona 20. Zgornji trije primeri (rdeča, modra in zelena) predstavljajo izražanje mRNA gena NF1 v triplikatu pri kontroli, spodnjih 6 pa pri pacientih (rjava, vijolična in oranžna so triplikati pri probandu in roza, siva ter temno zelena so triplikati pri njegovem očetu). Pri pacientih opazimo za polovico zmanjšano prisotnost eksona 20 (rdeče obkroženi eksoni 20) v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

Tretji primer

V genetsko ambulantno je bila napotena dvoletna deklica z epilepsijo, razvojnim zaostankom, motnjami mišičnega tonusa in dizmorfniimi znaki. Analiza aCGH je pokazala normalen ženski kariotip in analiza WES je pokazala prisotnost več različic nejasnega pomena in prenašalstvo za (verjetno) patogene različice v RARS1 in MBOAT7. Razširitev preiskave na WES TRIO je pokazal sestavljeno heterozigotno stanje dveh različic v genu RARS1; maternalne verjetno patogene različice s prezgodnjo vstavitvijo stop kodona (NM_002887.3):c.445G>T in paternalne intronske različice z neenotnimi teoretičnimi napovedovalci vpliva na alternativno spajanje eksonov (NM_002887.3):c.370-26A>G v genu RARS1. Analiza segregacije različic pri bratu deklice je pokazala, da je prenašalec maternalne različice. Klinične diagnoze RARS1 genopatije tako ni bilo mogoče niti potrditi, niti ovreči. Tarčna analiza mRNA je razkrila, da maternalna različica vodi do prezgodnje vstavitve stop kodona, medtem ko različica c.370-26A>G na očetovem alelu ne povzroči pomembne razlike v izražanju posameznih eksonov gena RARS1 v primerjavi s kontrolo. Na podlagi tega rezultata je diagnoza RARS1-genopatije pri deklici opuščena.

Zaključek

Pri redkih boleznih z veliko genetsko heterogenostjo, kot je npr. razvojni zaostanek je trenutno ocenjen diagnostičen izplen analiz DNA sekvenciranja na 25-30%, medtem ko se pri boleznih, ki so vezane na patogene različice enega gena ali manjšega števila genov, diagnostičen izplen giblje med 40% in 60% (PMID:35217565). Z namenom povečanja diagnostičnega izplena pri redkih monogenih boleznih se v klinično diagnostiko vpeljujejo raziskave na RNA nivoju (PMID:34906502), kar se je izkazalo za primerno dopolnitev genetskih preiskav tudi na Kliničnem inštitutu za genomsko medicino. Funkcionalna opredelitev genetskih različic na RNA nivoju in analiza celotnega transkriptoma omogočata neposreden vpogled v izražanja genov, kar je ključen podatek za pravilno klasifikacijo patogenosti različic z možnim vplivom na alternativno spajanje eksonov, ki so predhodno klasificirane kot različice nejasnega pomena in v primerih potrjevanja jasne klinične diagnoze, ko analizi WES in WGS ne ponudita odgovora.

Reklasifikacija različic nejasnega kliničnega pomena z analizo mRNA iz krvi

V. Šetrajčič Dragoš¹, G. Klančar¹, V. Stegel¹, P. Škerl¹, A. Blatnik², K. Strojnik², M. Krajc², S. Novaković¹

¹ Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenia

² Oddelek za onkološko klinično genetiko, Onkološki inštitut Ljubljana, 1000 Ljubljana, Slovenia

Uvod

Genetske različice lahko povzročijo nepravilno prepoznavo spojitvenih mest med procesom izrezovanja intronov in spajanja eksonov, ki ga izvrši izrezovalno-povezovalni kompleks med formiranjem zrele mRNA. Posledica tega je spremenjena mRNA molekula, kar je lahko vzrok za nastanek genetskih sindromov. Eden od načinov, da odkrijemo različice, ki povzročijo napačno prepoznavo spojitvenih mest je, da določimo neposreden vpliv različice na molekuli mRNA nosilca različice. Večina različic, ki imajo možen vpliv na izrezovanje intronov in spajanje eksonov so brez analize mRNA klasificirane kot različice nejasnega kliničnega pomena (VUS).

Materiali in metode

V študijo smo vključili 2808 zaporednih pacientov, ki so ustrezali kriterijem za genetsko testiranje za prisotnost okvar v genih povezanih z dednimi oblikami raka. Pri vseh pacientih smo z bioinformatičnimi orodji, ki ocenjujejo vpliv na izrezovanje intronov in spajanje eksonov, ocenili katere različice imajo možen patogen vpliv na zrelo mRNA. Nosilce vseh novih različic smo povabili na dodaten odvzem krvi v epruveto s stabilizatorjem RNA. Z novim pristopom analize mRNA (cDNA), smo uspešno izvedli oceno vpliva različic na izrezovanje intronov in spajanje eksonov za 32 različic. Vse različice smo na podlagi novih podatkov ponovno klasificirali.

Rezultati in diskusija

Na podlagi analize mRNA smo lahko dodelili dodaten ACMG/AMP dokaz v prid benignosti ali patogenosti za 25 različic (78 %). V naši raziskavi smo uspešno reklasificirali 65,6 % vseh VUS-ov, 34,4 % različic pa je ostalo klasificiranih v razred 3. V razred 2 (verjetno benigna različica) smo reklasificirali 46,9 % VUS-ov, medtem ko smo v razred 4 (verjetno patogena različica) reklasificirali 18,8 % vseh VUS-ov. Med leti 2018 in 2020 smo med 2808 preiskovanci odkrili 57 oseb (2 %), ki so nosile VUS s potencialnim vplivom na izrezovanje intronov in spajanje eksonov. Z drugimi besedami, potencialno korist od funkcijske opredelitve različice nejasnega kliničnega pomena ima lahko 1 na 49 preiskovancev. Od analize mRNA je imelo korist 39 preiskovancev (1,4 %), pri katerih smo VUS uspešno reklasificirali. Vzročno različico smo z analizo mRNA opredelili v 0,2 % pacientih/družinah, pri katerih smo sprožili tudi kaskadno testiranje družinskih članov.

Patogene različice v genih, povezanih z dednimi oblikami ginekoloških rakov v slovenski populaciji

Urška Kotnik, Aleš Maver, Bortu Peterlin, Luca Lovrečič

Klinični Inštitut za Genomsko Medicino, Univerzitetni klinični Center Ljubljana

Uvod: Dedne oblike ginekoloških rakov razumemo kot rakava obolenja dojk, jajčnikov, maternice in nekatere druge redke oblike ginekoloških rakov, katerih razvoj je povezan s prisotnostjo patogene različice, prisotne v enem od genov, povezanih z rakom. Dedne oblike ginekoloških rakov vključujejo dedni rak dojk in jajčnikov (povezan z genoma BRCA1 in BRCA2), sindrom Lynch (povezan z MMR geni), ter nekatere druge sindrome (Li-Fraumeni, Peutz-Jeghers, Cowden) in nekatere druge gene (ATM, BRIP1, CHEK2, RAD51C, RAD51D) (Angeli et al., 2020). Dedne oblike ginekoloških rakov predstavljajo velik delež vseh ginekoloških rakov in posamezniki, pri katerih je patogena različica prisotna, imajo do 72 % možnosti, da tekom življenja obolijo za rakom (Kuchenbaecker et al., 2017). Za dedne oblike ginekoloških rakov je značilna nepopolna penetranca, zato so patogene različice prisotne tudi pri posameznikih iz splošne populacije, brez anamneze raka, ki se svojega povečanega tveganja ne zavedajo. Breme patogenih različic v splošni populaciji ni poznano (Hu et al., 2021).

Metode: Z ACMG smernicami (Richards et al., 2015) smo klasificirali vse redke funkcionalne in znane patogene različice v 17-ih, z dednimi oblikami ginekoloških rakov povezanih genov, v populaciji 7091 slovenskih posameznikov, ki na genetsko testiranje na Klinični inštitut za genomsko medicino niso bili napoteni zaradi raka. Ta populacije predstavlja približek slovenske splošne populacije (0,35 %). Kot kontrolno populacijo smo uporabili populacijo podatkovne zbirke gnomAD (Karczewski et al., 2020).

Rezultati: Analiza je pokazala, da je 2,14 % naše preučevane populacije brez raka nosilcev patogene različice v enem izmed preučevanih genov (Preglednica 1) (Kotnik et al., 2023).

Preglednica 1: Prevalenca patogenih različic v slovenski populaciji

Genes	Število nosilcev različic v slovenski populaciji	Prevalenca nosilcev različic v slovenski populaciji (%)	Genes	Število nosilcev različic v slovenski populaciji	Prevalenca nosilcev različic v slovenski populaciji (%)
ATM	36	0,51	MSH6	5	0,07
BARD1	4	0,06	PALB2	9	0,13
BRCA1	28	0,40	PMS2	10	0,14
BRCA2	18	0,25	PTEN	NA	NA
BRIP1	3	0,04	RAD51C	9	0,13
CDH1	3	0,04	RAD51D	NA	NA
CHEK2	22	0,31	STK11	NA	NA
MLH1	3	0,04	TP53	NA	NA
MSH2	2	0,03	Vsota	152	2,14

V raziskava verjetno patogenih in patogenih različnih genih PTEN, RAD51D, STK11 in TP53 ni pokazala. Primerjava prevalenc slovenske populacije s kontrolno populacijo je pokazala, da je slovenska populacija statistično značilno obogatena s patogenimi različnicami v genih ATM, BRCA1 in CDH1 ($p < 0.005$). Slovenska populacija je prav tako statistično značilno osiromašena s patogenimi različnicami v genu CHEK2, kar je posledica nizke prevalenc različice c.1100del c slovenski populaciji.

Zaključki:

Zaključujemo, da je prevalenca patogenih različnih v genih, povezanih z dednimi oblikami ginekoloških rakov v slovenski populaciji posameznikov, ki na genetsko testiranje niso bili napoteni zaradi anamneze raka, 2,14 %. Predstavljamo prvo oceno bremena patogenih različnih v genih, povezanih z dednimi oblikami ginekoloških rakov v slovenski populaciji, ki je bila na genetsko testiranje napotena zaradi drugih diagnoz in v osebni in družinski anamnezi ni navedla obremenjenosti z rakom. Rezultat je hkrati tudi ena prvih ocen bremena na nacionalni ravni, v svetovnem merilu, ki bo omogočal primerjavo slovenske populacije z drugimi svetovnimi populacijami.

Viri:

1. Angeli, D., Salvi, S., & Tedaldi, G. (2020). Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: How many and which genes to test? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/doi.org/10.3390/ijms21031128>
2. Hu, C., Hart, S. N., Gnanaolivu, R., Huang, H., Lee, K. Y., Na, J., Gao, C., Lilyquist, J., Yadav, S., Boddicker, N. J., Samara, R., Klebba, J., Ambrosone, C. B., Anton-Culver, H., Auer, P., Bandera, E. V., Bernstein, L., Bertrand, K. A., Burnside, E. S., ... Couch, F. J. (2021). A population-based study of genes previously implicated in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 384(5), 440–451. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2005936>
3. Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., ... Daly, M. J. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434–443. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>
4. Kotnik, U., Maver, A., Peterlin, B., & Lovrecic, L. (2023). Assessment of pathogenic variation in gynecologic cancer genes in a national cohort. *Scientific Reports*, 13(1), 5307. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32397-8>
5. Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., & Consortium, and the B. and B. C. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*, 317(23), 2402–2416. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
6. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Različno izražene miRNA pri pediatričnih bolnikih z nefroblastomom

Tine Tesovnik ^{1,2}, Simona Lucija Avčin ^{2,3}, Klementina Črepinšek ^{1,2}, Barbara Jenko Bizjan ^{1,2}, Robert Šket ^{1,2}, Jernej Kovač ^{1,2}, Blaž Vrhovšek ^{1,2}, Janez Jazbec ^{2,3}, Maruša Debeljak ^{1,2}

¹ Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija.

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija.

³ Klinični oddelek za hematologijo in onkologijo, Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija.

Wilms tumor (WT), znan tudi kot pediatrični nefroblastom, je s pojavnostjo 1 na 10.000 otrok redka bolezen in najpogostejše maligno obolenje ledvic pri otrocih. Zaradi razvoja naprednih postopkov zdravljenja WT je stopnja umrljivosti v državah razvitega sveta precej nizka in znaša pod 5%, vendar pa je zdravljenje zahtevno in povzroča resne zdravstvene posledice, kar zmanjša kakovost življenja bolnikov.

V naši raziskavi smo z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) proučevali celoten profil izražanja mikroRNA (miRNA) v ledvičnem tkivu WT z namenom prepoznavanja potencialnih bioloških označevalcev za zgodnje odkrivanje bolezni. miRNA so majhne nekodirajoče molekule RNA, ki imajo poglobitno regulatorno vlogo uravnavanja stabilnosti sporočevalske RNA (mRNA) in njihovega prepisovanja v proteine, sodelujejo pa tudi pri uravnavanju drugih celičnih procesov. Z analizo pridobljenih podatkov NGS smo identificirali značilno povišano in znižano izražane miRNA v zamrznjenih tkivnih vzorcih (FFT) nefroblastoma in zdravega ledvičnega tkiva. Rezultate izražanja miRNA v FFT smo nato potrjevali z neodvisno skupino vzorcev z nefroblastomom in zdravim ledvičnim tkivom fiksiranih v formalinu in vklopljenih v parafin (FFPE). Primerjalna analiza značilno izraženih miRNA v tkivu WT pri vzorcih FFT in vzorcih FFPE je razkrila zmanjšano izražanje 27 miRNA in povečano izražanje 14 miRNA.

Potencialen vpliv različno izraženih miRNA v tkivu WT smo nato proučevali z obogatitveno analizo celičnih poti, ki je razkrila celične poti in potencialne regulirane gene, ki so povezani s pojavom malignih obolenj. Regulacijski vpliv miRNA na izražanje in stabilnost predpostavljenih reguliranih genov smo potrjevali s sekvenciranjem in analizo izražanja celotnega profila mRNA v zdravem in WT ledvičnem tkivu, kjer pa so se pokazale globalne spremembe v transkriptomu WT. Rezultati naše primerjalne raziskave so razkrili potencialne biološke označevalce miRNA za sledenje razvoja WT in potencialne tarče za njegovo zdravljenje. Izsledki so tudi osnova za nadaljnje raziskave bioloških označevalcev miRNA v urinu bolnikov z WT, s katerimi bomo poskušali opredeliti njihov potencial za zgodnje in neinvazivno odkrivanje WT pri posameznikih s patološkimi genetskimi spremembami v genih, povezanih s povečanim tveganjem za razvoj WT.

Različno izražene miRNA pri pediatričnih bolnikih z nefroblastomom

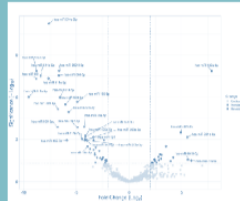
Primerjalna analiza izražanja miRNA in mRNA pri nefroblastomu - Wilms Tumor (WT)



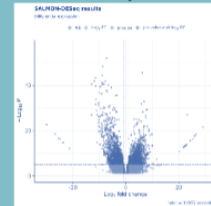
74 vzorcev: 37 vzorcev tumorskega tkiva in ujemajočih vzorcev zdravega ledvičnega tkiva. Neodvisna analiza glede na histološki stadij tumorja.

NGS sekvenciranje.

Različno izražanje miRNA



Različno izražanje mRNA



- 41 univerzalnih miRNAs pri WT:
27 miRNAs z znižanim izražanjem
14 miRNAs s povišanim izražanjem
- DE miRNA so povezane s patogenezo tumorja



- Globalna sprememba transkriptoma WT

Diagnostični izzivi pri sindromu CANVAS

Ivana Babić Božović^{1,*}, Helena Jaklič^{1,*}, Borut Peterlin^{1,2}, Anja Kovanda^{1,2}

¹ Klinični Inštitut za Genomsko Medicino, Univerzitetni klinični Center Ljubljana.

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija

* enakovredno prispevali k nastanku tega prispevka in si delita prvo avtorstvo.

Corresponding Author: Anja Kovanda, PhD, anja.kovanda@kclj.si

Cerebelarna ataksija z nevropatijo in vestibularno arefleksijo (angl. Cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome, CANVAS) je novo prepoznana, progresivna, nevrodegenerativna motnja, za katero se formalni diagnostični kriteriji še postavljajo. Pred kratkim je bilo ugotovljeno, da CANVAS povzročajo bialelne patogene ekspanzije s specifično sekvenco DNA v genu RFC1. Mesto, na katerem se nahaja ekspanzija je genetsko heterogeno, znotraj katerega pri zdravih osebah najdemo tudi ekspanzije z nepatogeno sekvenco, zato predstavlja potrjevanje CANVASA diagnostičen izziv.

Za specifično dokazovanje bialelnih patogenih ekspanzij v RFC1 smo zasnovali novo dvostopenjsko metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) z dokazovanjem fragmentov na kapilarni elektroforezi (ang. fragment capillary electrophoresis). Prva stopnja ali presejalni PCR je zasnovan za specifično dokazovanje kratkih alelov, s čemer lahko izključimo tipičen CANVAS. Druga stopnja ali potrjevalni PCR za potrjevanje patogene bialelne ekspanzije temelji na detekciji treh najpogostejših sekvenc ekspanzij, kar smo optimizirali na DNA pacientov z diagnozo CANVAS, že predhodno potrjeno s Southern blotom. Specifičnost pristopa je bila ovrednotena s testiranjem bolnikov z ataksijo z znanimi genetskimi diagnozami, ki niso povezane s CANVAS, kjer nismo zaznali prisotnosti patogenih bialelnih ekspanzij. Nazadnje smo z uporabo opisanega dvostopenjskega pristopa, testirali paciente, ki so bili napoteni ob kliničnem sumu na CANVAS. Genetsko potrditev sindroma CANVAS smo ugotovili pri bolnikih z vsaj tremi značilnimi kliničnimi znaki.

Novi dvostopenjski PCR z fragmentno kapilarno analizo predstavlja alternativno metodo za detekcijo CANVAS, ki zagotavlja informacije o prisotnosti bialelnih patogenih ekspanzij v genu RFC1 ter predstavlja novo orodje v laboratorijski diagnostiki ataksij.

Viri:

1. Cortese, A., Reilly, M. M., and Houlden, H. (1993). "RFC1 CANVAS / Spectrum Disorder," in *GeneReviews®*, eds. M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, et al. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564656/> [Accessed August 10, 2023].
2. Cortese, A., Simone, R., Sullivan, R., Vandrovцова, J., Tariq, H., Yau, W. Y., et al. (2019a). Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet* 51, 649–658. doi: 10.1038/s41588-019-0372-4.
3. Akçimen, F., Ross, J. P., Bourassa, C. V., Liao, C., Rochefort, D., Gama, M. T. D., et al. (2019). Investigation of the RFC1 Repeat Expansion in a Canadian and a Brazilian Ataxia Cohort: Identification of Novel Conformations. *Front Genet* 10, 1219. doi: 10.3389/fgene.2019.01219.

4. Beecroft, S. J., Cortese, A., Sullivan, R., Yau, W. Y., Dyer, Z., Wu, T. Y., et al. (2020). A Māori specific RFC1 pathogenic repeat configuration in CANVAS, likely due to a founder allele. *Brain* 143, 2673–2680. doi: 10.1093/brain/awaa203.
5. Cortese, A., Simone, R., Sullivan, R., Vandrovцова, J., Tariq, H., Yau, W. Y., et al. (2019b). Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet* 51, 649–658. doi: 10.1038/s41588-019-0372-4.
6. Cortese, A., Tozza, S., Yau, W. Y., Rossi, S., Beecroft, S. J., Jaunmuktane, Z., et al. (2020). Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to RFC1 repeat expansion. *Brain* 143, 480–490. doi: 10.1093/brain/awz418.
7. Ghorbani, F., De Boer-Bergsma, J., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Pennings, M., De Boer, E. N., Kremer, B., et al. (2022). Prevalence of intronic repeat expansions in RFC1 in Dutch patients with CANVAS and adult-onset ataxia. *J Neurol* 269, 6086–6093. doi: 10.1007/s00415-022-11275-9.
8. Nakamura, H., Doi, H., Mitsuhashi, S., Miyatake, S., Katoh, K., Frith, M. C., et al. (2020). Long-read sequencing identifies the pathogenic nucleotide repeat expansion in RFC1 in a Japanese case of CANVAS. *J Hum Genet* 65, 475–480. doi: 10.1038/s10038-020-0733-y.
9. Rafehi, H., Szmulewicz, D. J., Bennett, M. F., Sobreira, N. L. M., Pope, K., Smith, K. R., et al. (2019). Bioinformatics-Based Identification of Expanded Repeats: A Non-reference Intronic Pentamer Expansion in RFC1 Causes CANVAS. *The American Journal of Human Genetics* 105, 151–165. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.05.016.
10. Scriba, C. K., Beecroft, S. J., Clayton, J. S., Cortese, A., Sullivan, R., Yau, W. Y., et al. (2020). A novel RFC1 repeat motif (ACAGG) in two Asia-Pacific CANVAS families. *Brain* 143, 2904–2910. doi: 10.1093/brain/awaa263.
11. Tsuchiya, M., Nan, H., Koh, K., Ichinose, Y., Gao, L., Shimozono, K., et al. (2020). RFC1 repeat expansion in Japanese patients with late-onset cerebellar ataxia. *J Hum Genet* 65, 1143–1147. doi: 10.1038/s10038-020-0807-x.

Sponsorji



omegac

