



◀ **Izr. prof. dr. Damjan Osredkar, dr. med.**^{1,2}
Špela Miroševič, mag. biopsih.³
prof. dr. Roman Jerala^{4,5}

¹ Klinični oddelek za otroško, mladostniško in razvojno nevrologijo, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana

² Center za razvojno nevroznanost, Medicinska fakulteta Ljubljana, Univerza v Ljubljani

³ Katedra za družinsko medicino, Medicinska fakulteta Ljubljana, Univerza v Ljubljani

⁴ Odsek za sintezno biologijo in imunologijo, Kemijski inštitut, Ljubljana

⁵ Center za tehnologije genske in celične terapije, Ljubljana

CTNNB1 SINDROM – OD BOLNIKA DO ZDRAVILA

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 razvoju (1) 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 na 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



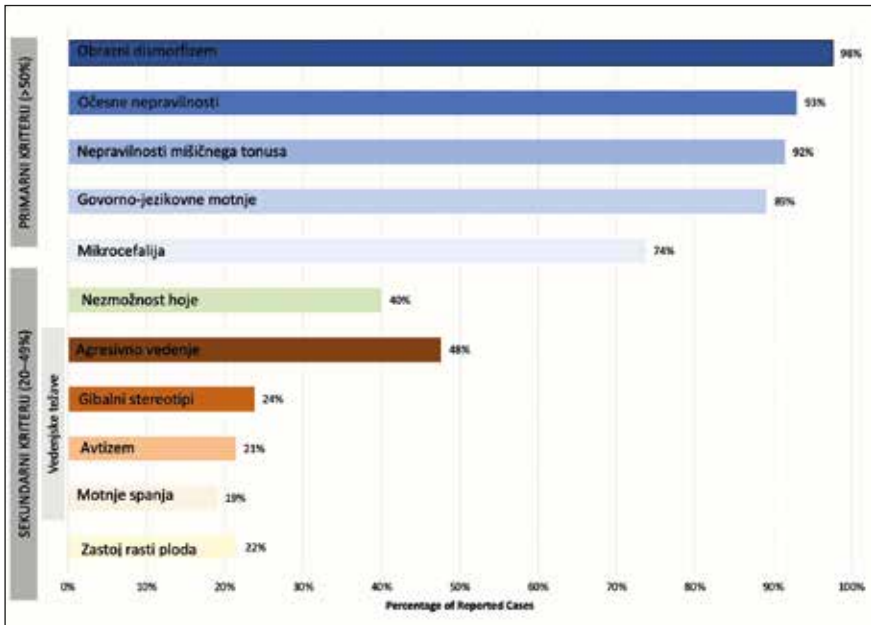
bralnega okvirja in mutacije spajanja) in se lahko pojavijo v celotnem kodirajočem območju CTNNB1.

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 procesov (6). 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 preoblikovanje (7).

Sindrom CTNNB1 se kaže v množici različno resnih razvojnih motenj, pa tudi s hipotonijo, spastičnostjo, kognitivnimi motnjami, težavami z govorom, vidom, mikrocefalijo (8). Najpogostejše težave povezane s sindromom predstavlja slika 1.

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 starša stopila v stik z nami in dejala, da bi rada dečku omogočila prejem genske terapije. Čeprav ta takrat še ni obstajala in ni bilo niti predkliničnih študij, v katerih bi takšno terapijo preskušali, sta bila odločena, da bosta naredila vse, da bi do takega zdravljenja deček prišel. S staršema smo najprej poskušali najti partnerje v Sloveniji in tujini, ki bi jih tak razvoj zanimal. V Sloveniji smo našli ključnega partnerja v raziskovalni skupini prof. dr. Romana Jerale



Slika 1. Najpogostejše težave povezane s sindromom CTNNB1 (9).

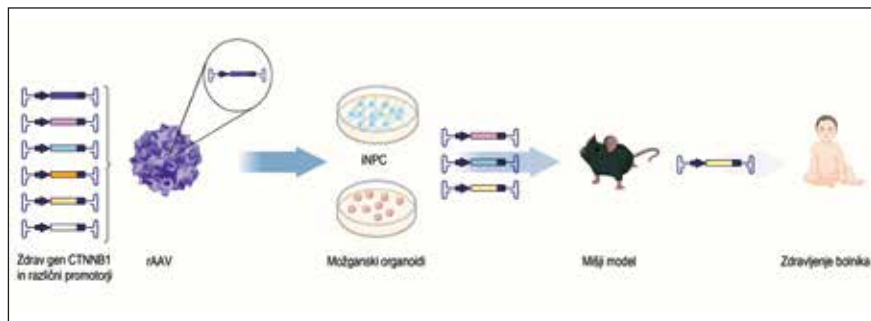
na Kemijskem inštitutu, v tujini pa v raziskovalni skupini izr. prof. dr. Leszka Lisowskega z Inštituta za medicinske raziskave otrok, CMRI (ang. Children's Medical Research Institute) v Avstraliji. Starša sta ustanovila fundacijo CTNNB1 (<https://ctnnb1-foundation.org/>), znotraj katere sta začela zbirati sredstva za prve korake predkliničnih raziskav. Skupina prof. Lisowskega je pričela z razvojem genske nadomestne terapije na Urbanovih celicah, medtem pa je skupina prof. Jerale pričela z iskanjem alternativnih poti zdravljenja s povečanjem 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 na 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, kjer sodelujemo zdravniki, raziskovalci in združenje bolnikov – sodelovanje je ključen pogoj za uspeh pri razvoju novih zdraviljenj.

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>).

Istočasno se z Evropsko agencijo za zdravila (EMA; <https://www.ema.europa.eu/>) že pogovarjamo, kako bi lahko najučinkovitejšo in najbolj 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 promotorji, 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 v bolnikove celice uspešno 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 za 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 resnično 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 preobrnili 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.

KAJ LAHKO NAREDI BOLNIK Z REDKO BOLEZNIJO V DANAŠNJEM ČASU

Bolnik, ki ima, ali sumi, da ima redko bolezen, se mora najprej povezati z zdravnikom, ki se spozna na določeno bolezen ali vrsto bolezni. Bolezen je potrebno najprej genetsko potrditi (ali ovreči), saj brez jasne diagnoze zdravljenje ni mogoče, pogosto pa je za zdravljenje potrebno imeti natančne podatke o genski napaki sami.

Za nekatere bolezni že obstajajo dokazano uspešna in varna zdravila in v Sloveniji imamo ta privilegij, da jih lahko v zelo kratkem času pripeljemo do bolnikov, če so odobrena s strani EMA, včasih celo pred tem. Praviloma takšna zdravljenja financira Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije. Tipičen primer takšnega zdravila, s katerim imamo odlične izkušnje, je zdravilo nusinersen za zdravljenje spinalne mišične atrofije (10).

Če zdravilo za bolezen še ne obstaja, ali je morda v razvoju, je najlažje preveriti na strani <https://clinicaltrials.gov/>. Če je zdravilo za redko bolezen že v preskušanju, je vredno kontaktirati izvajalce študije in se pozanimati, kakšne so možnosti za sodelovanje. Pogosto študije ne sprejemajo bolnikov iz drugih držav. Kljub temu da se za mnoge bolezni trudimo, da bi študije pripeljali tudi v Slovenijo, za nekatere nam je to tudi uspelo (npr., Pediatrična klinika sodeluje v študiji MIS510N, v kateri se uporablja zdravilo eteplirsen za zdravljenje Duchennove mišične distrofije pri otrocih), je odločitev v domeni sponzorja in sodelovanje pogosto ni mogoče.

Če je informacij za določeno bolezen malo in se zdi, da zdravilo ne obstaja, se je vredno obrniti za informacije na Nacionalno kontaktno točko za redke bolezni (<https://www.redkebolezni.si/>) ali kontaktno točko Centra za tehnologije genske in celične terapije, ki bo pričel z delom v nekaj letih (<https://ctgct.si/>), kjer bodo razvijali tehnologije za napredne pristope celičnega in genskega



zdravljenja, ki bi jih lahko v sodelovanju z zdravniki privedli do bolnikov za klinične raziskave.

Za veliko redkih bolezni obstajajo združenja pacientov, ki o določeni bolezni veliko vedo in so pomemben vir informacij za bolnike in tudi njihove zdravnike in pogosto zbirajo sredstva za razumevanje bolezni in razvoj zdravil. V Združenih državah Amerike obstaja spletna stran, ki tem organizacijam ob pomoči zdravnikov in raziskovalcev lajša pot do razvoja genskega zdravljenja (<https://www.opentreatments.org>).

ZAKLJUČEK

Področje redkih bolezni doživlja neverjeten razmah in čeprav 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.



LITERATURA

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
10. Osredkar D, Jílková M, Butenko T, et al. Children and young adults with spinal muscular atrophy treated with nusinersen. *European Journal of Paediatric Neurology*. 2021;30:1-8. doi:10.1016/j.ejpn.2020.11.004