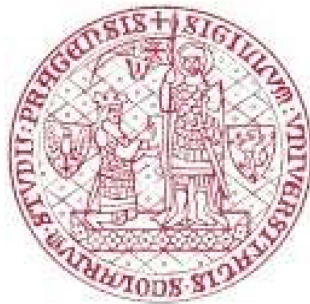


**UNIVERZITA KARLOVA
2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Nové přístupy vedoucí ke stanovení patofyziologických změn u pacientů s cystickou
fibrózou**

**New approaches to determination pathophysiological changes in patients with cystic
fibrosis**

Tereza Doušová

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného studia* doktorského studijního programu *Fyziologie a patofyziologie člověka na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy*

Školitel: *prof. MUDr. Pavel Dřevínek, Ph.D.*

Konzultant: *doc. MUDr. Libor Fila, Ph.D.*

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady *Fyziologie a patofyziologie člověka* dne v od
hod. Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:
Prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.
Fyziologický ústav 1. LF UK

Děkan fakulty: *prof. MUDr. Vladimír Komárek, CSc.*

Tato práce vznikla za podpory grantu
GAUK – číslo grantu 412217

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

1. OBSAH

1. OBSAH	3
2. ABSTRAKT	4
3. ABSTRACT	5
4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
5. HYPOTÉZY A CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	10
6. MATERIÁL A METODIKA.....	12
7. VÝSLEDKY	14
8. DISKUZE	18
9. VZTAH PRÁCE K TESTOVANÝM HYPOTÉZÁM	21
10. ZÁVĚRY.....	22
11. CONCLUSIONS	23
12. POUŽITÁ LITERATURA.....	24
13. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	27

2. ABSTRAKT

Nové přístupy vedoucí ke stanovení patofyziologických změn u pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je život limitující onemocnění způsobené mutací genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator). Do dnešního dne bylo popsáno více než 2000 mutací CFTR genu, z toho pouze 360 v přímé souvislosti se vznikem onemocnění CF. U pacientů nesoucích mutace s nejasným či variabilním klinickým významem může být obtížná nejen diagnostika CF, ale pro nemožnost uspořádání standardních klinických studií je také výzvou zjišťování účinnosti nových léků, které cílí na narušený CFTR protein. Tyto tzv. modulátory CFTR proteinu otevřely novou etapu kauzální léčby CF. Zásadní pro maximalizaci efektu terapie je nejen genotyp, ale také skutečná míra odpovědi jednotlivého pacienta na léčbu. Intestinální organoidy představují v posledních letech *ex vivo* model využitelný ke stanovení míry funkce CFTR proteinu a současně k predikci léčebné odpovědi na dostupné léčebné molekuly. V rámci našeho projektu jsme s využitím nativní tkáně pacienta a z ní odvozených kultur intestinálních organoidů prokázali různou míru reziduální funkce CFTR proteinu u celkem 14 pacientů s CF (0–39,7 % funkce zdravé kontroly). Charakterizovali jsme doposud nepopsanou mutaci CFTR genu u pacienta, jehož diagnóza nebyla doposud na základě standardních diagnostických metod jednoznačná. Na základě *ex vivo* predikce jsme identifikovali v 8 případech potenciální respondery a v 5 případech non-respondery na dostupné modulátory CFTR proteinu. Translace tohoto výzkumu do klinické praxe se stává ve shodě s principem theranostiky základem pro personalizovanou péči o všechny pacienty s CF.

3. ABSTRACT

New approaches to determination pathophysiological changes in patients with cystic fibrosis

Cystic fibrosis (CF) is a life-limiting disease caused by mutation in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene. To date, more than 2,000 mutations in the CFTR gene have been described, of which only 360 are directly related to CF. In a group of patients carrying mutations of unknown or variable clinical significance, it may be difficult not only to diagnose CF but also to facilitate clinical studies to determine the efficacy of new low - molecular weight compounds targeting disrupted CFTR protein. These so-called CFTR modulators have opened a new era in causal treatment of CF. To maximize the effect of these new therapies, not only the patient's genotype, but also the individual rate of response is crucial. In recent years, intestinal organoids have been used as an *ex vivo* model to determine the degree of CFTR function and at the same time to predict the therapeutic response to available therapeutic molecules. In our project, using the patient's native tissue and cultures of intestinal organoids derived from this tissue, we demonstrated varying degrees of CFTR residual function in a total of 14 patients with CF (0–39.7% of healthy control function). We characterized de novo mutation of the CFTR gene in a patient whose diagnosis has not been confirmed using available standard diagnostic methods. Based on *ex vivo* prediction, we identified potential responders to available CFTR modulators in 8 cases and non-responders in 5 cases. Translation of this research into clinical practice becomes, in accordance with the principle of theranostics, the basis for personalized care for all patients with CF.

4. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Cystická fibróza (CF) je nejčastější život limitující monogenně podmíněné onemocnění, postihující více než 100.000 pacientů na celém světě (Shteinberg et al., 2021). Příčinou je mutace v genu pro transmembránový regulátor vodivosti (CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), plnicím funkci iontového přenašeče na apikální membráně epitelových buněk. Typický fenotyp CF představuje těžké postižení plic zhoršující se s věkem pacienta. Ostatní symptomy zahrnují pankreatickou insuficienci, zvýšenou hladinu chloridů v potu a v případě mužů neplodnost. Limitujícím faktorem pro přežití pacientů s CF však zůstává plicní onemocnění. Podezření na diagnózu CF je ve většině případů stanoveno na základě typického klinického obrazu, resp. positivity novorozeneckého screening (pokud se provádí). K potvrzení diagnózy je nezbytný 1) průkaz dysfunkce CFTR proteinu, která se v běžné praxi ozřejmí potním testem (stanovujícím hladinu chloridů v potu, abnormální hodnoty ≥ 60 mmol/l) a/nebo 2) nález dvou mutací CFTR genu se známou korelací s onemocněním CF (tzv. mutace způsobující CF) (Farrell et al., 2008; Farrell et al., 2017). V případě nejednoznačných výsledků potního testu (30–60 mmol/l) a molekulárně genetického vyšetření (nález jen jedné mutace způsobující CF) lze upřesnit diagnózu pomocí transepiteliálního rozdílu potenciálů na nosní (NPD, nasal potencial difference), případně rektální sliznici (ICM, intestinal current measurement) (Sermet-Gaudelus et al., 2010; Derichs et al., 2010).

Do dnešního dne bylo popsáno více než 2.000 variant genu CFTR, z nichž jen u malého počtu (celkem 360) byla jednoznačně prokázána kauzalita s onemocněním CF (mutace označované jako způsobující CF) (CFTR2.org, 2020). Nejčastější mutaci způsobující onemocnění CF představuje F508del, přítomná alespoň na jedné alele u více než 80 % pacientů s CF. Ze zbývajících 359 se pouze 6 mutací vyskytuje ve frekvenci vyšší než 1 % a 50 mutací s frekvencí vyšší než 0,1 %, s ohledem k určité variabilitě vázané na specifické populace (Lopes-Pacheco, 2020) Mechanismus, kterým jednotlivé mutace zasahují do tvorby nebo funkce CFTR proteinu, a tím ovlivňují i výsledný fenotyp onemocnění, se liší. S ohledem na tyto mechanismy byly mutace CFTR genu rozděleny do 6 funkčních tříd. Mutace I. třídy vedou k tvorbě zkráceného a nefunkčního proteinu. Mutace II. třídy dávají vzniknout strukturálně abnormálnímu proteinu, který nevycestuje intracelulárně adekvátně k buněčné membráně. V případě mutací III. a IV. třídy protein vycestuje normálně k povrchu buňky, avšak jeho funkce je alterována, v prvním případě ve smyslu nedostatečného otevírání kanálku nebo v druhém případě nedostatečným vedením iontů

kanálkem. V. třída mutací vedou k nedostatečné tvorbě CFTR proteinu a tím jeho sníženému množství na povrchu buňky. Mutace VI. třídy mají za následek zkrácení životnosti proteinu díky jeho strukturální nestabilitě. Zmíněné funkční třídy se současně staly základem pro specifické terapie zaměřené na jednotlivé typy mutací. V rámci tohoto přístupu lze s určitou mírou nepřesnosti prohlásit, že jedna léčivá molekula může být účinná na všechny mutace uvnitř stejné funkční třídy (De Boeck a Amaral, 2016).

Symptomatická léčba (inhalace, antibiotika, fyzioterapie, trávicí enzymy), na rozdíl od léčby kauzální, neřeší molekulární defekt samotného onemocnění. V posledních letech je výzkum v oblasti CF zaměřen na vývoj nových terapií směřujících k záchraně ztracené funkce CFTR proteinu. Nové léčebné molekuly, které jsou schopny zlepšit nebo dokonce opravit funkci narušeného CFTR proteinu, označujeme jako tzv. modulátory CFTR proteinu. Podle mechanismu, kterým na záchranu funkce CFTR proteinu působí, je rozdělujeme do 4 hlavních skupin: potenciátory, korektory, stabilizátory a amplifikátory (Lopes-Pacheco, 2016). Zatímco potenciátory zvyšují omezené otevírání CFTR kanálu a účinkují tak jen v situacích, kdy je protein přítomen na membránách buněk, působí korektory v kaskádě syntézy CFTR o krok dříve a upravují chybu intracelulárního vycestování špatně nařasené bílkoviny směrem k buněčné membráně. V případě stabilizátorů vede ukotvení CFTR proteinu na plazmatické membráně k prevenci předčasné degradace proteinu lysozomy. Konečně amplifikátory zvyšují expresi CFTR mRNA a tím i syntézu CFTR proteinu (Lopes-Pacheco, 2020). V současné době jsou k dispozici čtyři CFTR modulátorové léky. Všechny dohromady mohou z hlediska genotypu účinkovat u přibližně 90 % všech pacientů s CF. Ivakaftor (VX-770, Kalydeco[®], Vertex Pharmaceuticals, USA), byl vůbec prvním CFTR modulátorem (potenciátorem), schváleným v roce 2012 ke klinickému využití u pacientů nesoucích nejčastější mutaci III. třídy G551D. Tento potenciátor byl později na základě in vitro studií schválen FDA pro větší počet mutací s reziduální funkcí (např. 3849+10kb C>T, 2789+5G>A z celkových 38), byť v jejich případě se prokázal vyšší účinek potenciátoru, je-li kombinován s korektorem (Rowe et al., 2017). V roce 2015 následovala první kombinace CFTR korektoru lumakaftoru s ivakaftorem (VX-809/770, Orkambi[®], Vertex Pharmaceuticals, USA), která vedla ke zlepšení hodnot plicních funkcí a snížení počtu akutních exacerbací u pacientů s mutací F508del v homozygotní konstituci (Wainwright et al., 2015). Obdobného efektu bylo dosaženo kombinací korektoru tezakaftoru s ivakaftorem (VX-661/770, Symkevi[®], Vertex Pharmaceuticals, USA) schváleným od roku 2018. Přípravek Symkevi byl později schválen FDA pro léčbu dalších 26 mutací s reziduální funkcí

(přítomných v heterozygotní konstituci s mutací F508del), u kterých byla prokázána in vitro odpovídavost k tezakaftoru s ivakaftorem (Davies et al., 2018). Novou generaci CFTR korektoru představuje elexakaftor. V kombinaci s tezakaftorem a ivakaftorem (VX-445/661/770, Kaftrio[®], Vertex Pharmaceuticals, USA) představuje průlomový lék pro pacienty nesoucí mutaci F508del alespoň na jedné alele. Schválen ke klinickému použití byl v roce 2019, klinické studie prokázaly významné zlepšení funkce plic, snížení hladiny chloridů v potu a zlepšení stavu výživy (Middleton et al., 2019).

Široké spektrum mutací CFTR genu zahrnuje mnoho vzácných a velmi vzácných variant, u kterých doposud nebyl popsán přesný mechanismus vzniku defektního proteinu a nelze tak stanovit příslušnost k určité funkční třídě mutací. Každá z těchto variant postihuje celosvětově pouze několik jednotlivců, proto je v těchto případech obtížné predikovat průběh a tíži samotného onemocnění. Velkou výzvou je nejen diagnostika samotného onemocnění, ale současně i predikce možného léčebného potenciálu již dostupných modulátorů CFTR proteinu. Za účelem rozdělení variant CFTR genu podle jejich reaktibility na dostupné modulátory CFTR proteinu se v posledních letech objevuje termín ‘theratyp’ nebo také ‘theratyping’. Z pohledu dělení mutací se jedná o alternativní systém k funkční klasifikaci. Podstatnější je však jeho alternativní role ke klasickým klinickým studiím, díky kterému by bylo možné s využitím vlastní tkáně pacienta predikovat jeho individuální odpověď na dostupné léčebné molekuly (Amaral et al., 2019). V rámci tohoto systému by mohly být již klasifikované i doposud nezařazené varianty mutací a přiřazeny do určitých ‘theratypových’ skupin. Selektce nejvhodnější kombinace léků pro jednotlivé theratypové skupiny (tzv. ‘theranostika’) by vedla cestou cílených klinických studií (v uspořádání N=1) k efektivnějšímu nasazení léčebných molekul v klinické praxi. Hlavním cílem theranostiky je tedy co nejpřesnější *ex vivo* charakteristika reaktibility mutací CFTR genu na dostupné modulátory CFTR proteinu a jejich následné zařazení do příslušných terapeutických skupin (Clancy et al., 2019). Za ústřední nástroje theranostiky lze v evropském kontextu považovat měření elektrického napětí na rektální sliznici a bobtnání intestinálních organoidů.

***Ex vivo* modely**

Měření rozdílu elektrického napětí na rektální biopsii v Ussingově komůrce

Měření elektrického napětí na vzorcích rektální biopsie (ICM, intestinal current measurement) v Ussingově komůrce bylo představeno již před dvěma dekádami jako nová možnost *ex vivo* diagnostiky CF. (Mall et al., 2004; Hirtz et al., 2004) Principem vyšetření je přímé nebo nepřímé (v závislosti na metodě uzavřeného nebo otevřeného elektrického obvodu) měření transepiteliálního elektrického napětí a jeho změn. Tyto změny nastávají v důsledku omývání buněk střevní sliznice umístěných v měřicí komůrce z apikální i bazolaterální strany přesně definovanými roztoky. Ekvimolárním roztokem (Ringerův roztok) je omývána bazolaterální strana buněčné membrány k zajištění její elektroneutality, látky jako amilorid, karbachol, forskolin/3-isobutyl-methylxanthin (IBMX) a indomethacin omývají apikální stranu buněčné membrány a působí očekávané změny jejího napětí v korelaci s mírou funkce CFTR proteinu. Samotnou funkci CFTR proteinu determinuje reakce na cAMP a kalcium dependentní aktivátory, tedy forskolin, IBMX a karbachol.

Intestinální organoidy a forskolinem indukované bobtnání organoidu

Krypty střevní sliznice člověka obsahují primitivní nediferencované buňky, které je současnými technikami možno izolovat a za standardizovaných podmínek vytvořit sérii kultur a pasážování cirkulárně uzavřenou strukturu s vnitřním lumen, tzv. organoid. Lumen organoidu je tvořeno diferencovanými buňkami, napodobujícími vnitřní strukturu střeva *in vivo*. Je známo, že diferencované střevní buňky člověka exprimují na apikální membráně dostatečné množství CFTR proteinu. CFTR protein exprimovaný na apikální membráně organoidu po stimulaci forskolinem způsobí zvýšené proudění iontů a vody do lumen organoidu, a tím i objektivně měřitelné zvětšení jeho objemu (bobtnání). Toto bobtnání je možné po adekvátním značení (kalceinem) pozorovat a kvantifikovat pomocí fluorescenčního mikroskopu (tzv. FIS, Forskolin induced swelling assay). U pacientů s CF je bobtnání organoidu dramaticky sníženo úměrně s mírou ztráty funkce CFTR proteinu a současně vykazuje určitou míru variability mezi pacienty nesoucími totožné kombinace mutací. Pomocí FIS je možné *ex vivo* zhodnotit míru funkce CFTR proteinu a současně predikovat míru odpovědi na dostupné modulátory CFTR proteinu. Výhodou FIS, v porovnání s analýzami na rektálních biopsiích, je možnost tvorby velkého množství organoidů odvozených z kultur primárních nediferencovaných buněk krypt střevní sliznice, které je možné zamrazit k jejich potenciálnímu využití v budoucnosti.

5. HYPOTÉZY A CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Tradiční fyziologické metody sloužící k diagnostice pacientů s CF (NPD, koncentrace chloridů v potu) se v posledních letech rozšířily o nové přístupy, díky kterým jsme schopni prohloubit poznání patofyziologických změn na úrovni samotného CFTR proteinu. Pokroky v biologii kmenových buněk vedly k tvorbě organoidových kultur využívajících různé zdroje tkáně jako střevo, plíce nebo ledviny (Clevers, 2016). V případě CF jsou to intestinální organoidy, které lze vytvořit sérií kultivací z rektální biopsie pacienta. Provedená FIS assay na intestinálních organoidech pak reflektuje míru funkce CFTR proteinu a dle pilotních studií koreluje s predikovaným fenotypem onemocnění a s dalšími biomarkery funkce CFTR, jako koncentrace chloridů v potu a ICM (de Winter et al., 2018).

Určitá část pacientů s CF nese jednu nebo dvě mutace s nejasným nebo velmi variabilním klinickým významem (~1–4% incidence, hodnocené podle celosvětové CFTR2 databáze pacientů s CF). V případě pacientů nesoucích tyto mutace může být obtížná nejen samotná diagnostika onemocnění CF, ale pro nemožnost uspořádání standardních klinických studií je také výzvou pro zjišťování účinnosti nových léků na každou jednotlivou mutaci zvlášť. Současně odpověď na již dostupné modulátory CFTR proteinu vykazuje určitou míru variability i mezi pacienty nesoucími totožné mutace CFTR genu (např. F508del v homozygotní konstituci). Cílem našeho projektu bylo s využitím experimentálních metod (ICM, FIS assay) analyzovat tkáň:

1) Pacientů s klasickou formou CF: jednalo se o dva sourozence nesoucí nejčastější mutaci CFTR genu F508del v homozygotní konstituci. Na této sourozenecké dvojici jsme chtěli demonstrovat interindividuální variabilitu míry funkce CFTR proteinu a současně *ex vivo* reaktivity na dostupné modulátory CFTR proteinu. Pro pacienty nesoucí mutaci F508del v homozygotní konstituci již byla v době našeho projektu schválena léčba přípravkem Orkambi a Symkevi.

2) Pacientů s atypickou formou CF: jednalo se o celkem 10 pacientů nesoucích alespoň jednu vzácnou mutaci s předpokládanou reziduální funkcí CFTR proteinu vedoucí k variabilnímu fenotypu CF. U této skupiny pacientů jsme chtěli kvantifikovat míru funkce CFTR proteinu jednotlivého pacienta a současně *ex vivo* predikovat reaktivitu na dostupné modulátory CFTR proteinu. V době našeho projektu byla schválena léčba přípravkem Symkevi pro pacienty nesoucí mutace s reziduální funkcí pouze v kombinaci

s mutací F508del. Naším cílem bylo analyzovat i tkáně pacientů nesoucí na druhé alele mutaci vzácnou a v případě signifikantní *ex vivo* reaktivity se pokusit o nasazení příslušné léčby. Do hodnocené skupiny byly také zařazeny sourozenské dvojice, na kterých jsme chtěli demonstrovat interindividuální variabilitu a podíl genetického pozadí (genů modifikujících CF) každého jednotlivého pacienta.

3) Pacientů nesoucí velmi vzácné mutace CFTR genu: jednalo se o celkem 2 pacienty. U prvního z nich byla popsána nová, doposud necharakterizovaná mutace CFTR genu a stanovení diagnózy CF nebylo v jeho případě na základě standardních diagnostických metod jednoznačné. V případě druhém se jednalo o pacienta s velmi vzácnou mutací, jejíž klinický fenotyp nebyl doposud dostatečně popsán. V obou případech jsme chtěli s využitím experimentálních *ex vivo* metod určit míru funkce CFTR proteinu a současně predikovat možný klinický benefit z nasazení léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu.

VĚDECKÁ HYPOTÉZA

1) FIS a ICM představují experimentální *ex vivo* modely využitelné ke zhodnocení míry funkce CFTR proteinu u (i) pacientů se dvěma mutacemi způsobujícími klasickou formu CF (ii); u pacientů s jednou či dvěma vzácnými mutacemi způsobujícími variabilní fenotyp onemocnění a mírnou formu CF; (iii) u pacientů s nejasnou diagnózou CF na základě nejednoznačných výsledků potního testu a/nebo molekulárně genetického vyšetření

2) FIS assay na intestinálních organoidech lze využít k *ex vivo* identifikaci responderů na dostupné modulátory CFTR proteinu

6. MATERIÁL A METODIKA

Do projektu byli zařazeni pacienti a) s potvrzenou diagnózou CF nesoucí dvě mutace s minimální reziduální funkcí CFTR proteinu nebo alespoň jednu vzácnou mutaci s reziduální funkcí CFTR proteinu, b) nesoucí mutaci s nejasnou kauzalitou k onemocnění CF. Experimenty byly provedeny v laboratořích BioISI Institutu Univerzity v Lisabonu (pod vedením prof. Margaridy Amaral) a Univerzity v Regensburgu (pod vedením prof. Karla Kunzelmana). Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole. Informovaný souhlas byl podepsán pacientem nebo oběma zákonnými zástupci v případě nezletilého pacienta.

Analýza funkce CFTR proteinu

Měření v Ussingově komůrce

Rektální biopsie byly analyzovány za podmínek otevřeného elektrického okruhu v kontinuálně promývané Ussingově komůrce dle dříve popsanych postupů (Mall et al., 2004; Sousa et al., 2012). Po ukončení ekvibrace byla tkáň omývána specifickými experimentálními roztoky (viz výše). Pomocí software Power Lab (AD Instruments Inc., Nový Zéland) byly nejprve zaznamenávány hodnoty bazálního transepiteliálního napětí (V_{te}). Tyto hodnoty byly vztaženy k bazální straně střevního epitelu. Dále byly aplikací intermitentních (délka 1 s, perioda 5 s) výbojů elektrického proudu ($\Delta I = 0,5 \mu A$) kontinuálně měřeny odpovídající změny transepiteliálního napětí (ΔV_{te}). Následně byla s ohledem na velikost analyzované tkáně ($A, area$) determinována transepiteliální elektrická rezistence ($R_{te} = \Delta V_{te} / \Delta I \times A$). Po náležitě korekci k elektrické rezistivitě roztoku a odečtení elektrické rezistence prázdné komůrky byl dle Ohmova zákona vypočítán ekvivalent proudu v uzavřeném elektrickém obvodu ($I_{eq - sc} = V_{te} / R_{te}$). Měření byla provedena na 1–5 vzorcích od každého pacienta. Percentuální vyjádření míry funkce CFTR proteinu bylo vypočítáno jako průměrná hodnota maximální aktivace CFTR proteinu vztažená k průměrné hodnotě maximální aktivace referenční zdravé skupiny ($-217.45 \mu A/cm^2$), 30 % funkce wt-CFTR (wild type CFTR) bylo již dříve stanoveno jako práh k odlišení zdravého jedince a pacienta s diagnózou CF (viz kap. 2.7.1. výše) (Hirtz et al., 2004; Sousa et al., 2012).

Intestinální organoidy a FIS assay

Izolace krypt z rektálních biopsií získaných od pacientů s CF, kultury intestinálních organoidů a FIS assay byly provedeny dle dříve popsanych postupů laboratoře v Utrechtu (Holandsko) (Dekkers et al., 2013). Organoidy byly usazeny v matrigelu v předeřtávané 96jamkové destičce a inkubovány během 24 hodin s CFTR korektory, VX-809 (3 μ M, Selleckchem, USA) nebo VX-661 (5 μ M, Selleckchem, USA). Po nabarvení kalceinovou zelení bezprostředně před samotným experimentem (3 μ M) (Invitrogen, USA), byly přidány roztoky 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μ M forskolinu (Fsk, Sigma-Aldrich, USA) nebo kombinace vzestupné koncentrace forskolinu a CFTR potenciátoru VX-770 (3 μ M, Selleckchem, USA). V průběhu celého experimentu (60 minut) byly každých 10 minut pořizovány snímky zachycující bobtnání organoidu, které byly dále analyzovány pomocí software Cell Profiler (Broad Institute's Imaging Platform, USA). Výsledná data byla vyhodnocena vlastním software laboratoře (Organoid Explorer) a dále pomocí GraphPad Prism 7.0. Tímto způsobem byla provedena kvantifikace zvětšení plochy organoidu vztážená k ploše organoidu v čase nula (normalized organoid area, normalizovaná plocha organoidu) za rozdílných koncentrací forskolinu. Vlastní bobtnání organoidu bylo dále vyjádřeno jako absolutní hodnota plochy pod křivkou (AUC, area under curve) vypočítaná z normalizované plochy organoidu. Výsledná hodnota AUC je průměrem ze tří nezávisle provedených experimentů. Vlastní zlepšení funkce CFTR proteinu je výsledkem rozdílu hodnot AUC mezi kontrolami (jen s forskolinem) a léčenými organoidy (Fsk + VX-809; Fsk + VX-770; Fsk + VX-809/770; Fsk + VX-661; Fsk + VX-661/770). Na základě dosud provedených studií byla stanovena koncentrace forskolinu 0,128 μ M jako referenční pro hodnocení možného klinického benefitu in vivo. Hodnoty AUC 750 a 1500 jako práh pro potenciální střední a vysoký klinický benefit. Hodnoceným parametrem je i fenotyp organoidů za bazálních podmínek bez přidávaných léčebných molekul, odlišný v případě organoidů zdravé kontroly, pacienta s minimální nebo přítomnou reziduální funkcí CFTR proteinu (Dekkers et al., 2016).

Statistická analýza

Statistické rozdíly byly stanoveny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Data jsou vyjádřena jako průměrné hodnoty \pm standardní odchylky od průměru (SEM). Za signifikantní byla považována hodnota $p < 0.05$.

7. VÝSLEDKY

Pacienti, analyzované vzorky

1. Pacienti s klasickou formou CF

F508del/F508del

Analýzy rektálních biopsií u sourozenců CF1 a CF2 prokázaly minimální reziduální funkci CFTR proteinu (v obou případech 0 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má charakter organoidů pacienta s minimální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF1 prokázala signifikantní bobtnání organoidů po přidání kombinace molekul VX-809/770 a VX-661/770. Míra bobtnání v obou případech jen těsně nedosahuje prahu pro předpokládaný střední klinický benefit. Tento pacient by pravděpodobně mohl profitovat z nasazení léčby Orkambi® nebo Symkevi®. FIS assay pacienta CF2 prokázala nulové bobtnání organoidů bez ohledu na přidané léčebné molekuly. Pacient CF2 pravděpodobně nebude profitovat z léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu.

2. Pacienti s jednou/dvěma vzácnými mutacemi a variabilním fenotypem CF

D1152H/F508del

Analýza rektálních biopsií pacienta CF3 prokázala vysokou reziduální funkci CFTR proteinu (35,5 % funkce wt-CFTR). Fenotyp intestinálních organoidů pacienta za bazálních podmínek má charakter organoidů zdravé kontroly. FIS assay pacienta CF3 prokázala signifikantní bobtnání organoidů po přidání VX-770 i kombinace VX-809/770 či VX-661/770. Ve všech případech se míra bobtnání pohybovala nad prahem pro potenciálně vysoký klinický benefit pro pacienta. Tento pacient by pravděpodobně mohl profitovat z nasazení léčby Kalydeco® nebo Symkevi®.

D1152H/N1303K

Analýzy rektálních biopsií sourozenců CF4 a CF5 prokázaly vysokou míru reziduální funkce CFTR proteinu u obou pacientů (29,5 % a 39,7 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má v obou případech charakter organoidů zdravé kontroly. FIS assay pacienta CF4 prokázala signifikantní bobtnání organoidů po přidání VX-770 nebo kombinace VX-661/770 (kombinaci VX-809/770 jsme v tomto případě

netestovali). Míra bobtnání se v obou případech pohybovala nad prahem pro potenciální vysoký klinický benefit pro pacienta. Podobný profil prokázala FIS assay pacienta CF5. Oba sourozenci by pravděpodobně mohli profitovat z nasazení léčby Kalydeco® nebo Symkevi®.

3849+10kbC>T/F508del

Analýzy rektálních biopsií sourozenců CF6 a CF7 prokázaly reziduální funkci CFTR proteinu (4,2 % a 1,8 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů obou pacientů za bazálních podmínek má charakter organoidů s přítomnou reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF6 prokázala signifikantní bobtnání organoidů po přidání kombinace VX-809/770 a VX-661/770, s dosažením prahu pro potenciální střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Pacient CF6 by mohl klinicky profitovat z nasazení přípravku Orkambi® nebo lépe Symkevi®. V případě pacienta CF7 pozorujeme velmi podobný profil odpovědi, s dosažením prahu pro potenciální střední klinický benefit v případě obou přidávaných kombinací. Také pacient CF7 by mohl klinicky profitovat z nasazení přípravku Orkambi® nebo Symkevi®.

3849+10kbC>T/ dele2,3(21kb)

Analýza rektálních biopsií pacienta CF8 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (7,9 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má charakter organoidů s reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF8 prokázala signifikantní bobtnání nejen po přidání VX-770, ale ve větší míře po přidání VX-809/770 nebo VX-661/770. Míra bobtnání organoidů dosahuje ve všech případech prahu pro potenciální vysoký klinický benefit. Tento pacient by mohl profitovat z nasazení léčby Kalydeco®, Orkambi® nebo Symkevi®

3849+10kbC>T/621+1G>T

Analýza rektálních biopsií pacienta CF9 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (6,6 % funkce wt-CFTR). FIS assay pacienta CF9 se bohužel nepodařilo provést, technicky se nezdařila izolace krypt a následná kultivace intestinálních organoidů.

2789+5G>A/F508del

Analýzy rektálních biopsií sourozenců CF10 a CF11 prokázaly reziduální funkci CFTR proteinu (5,5 % resp. 1,5 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má v případě pacienta CF10 charakter organoidů s reziduální funkcí, v případě pacienta CF11 organoidů s minimální funkcí. FIS assay pacienta CF10 prokázala signifikantní odpověď po přidání VX-770 i kombinace VX-809/770 nebo VX-661/770. Prahu pro potenciální střední klinický benefit dosahuje odpověď po přidání VX-661/770 nebo ještě významněji VX-809/770. Pacient CF10 by mohl profitovat z nasazení léčby Symkevi® nebo lépe Orkambi®. V případě pacienta CF11 FIS assay neprokázala signifikantní bobtnání po přidání samotného potenciátoru či kombinace léčebných molekul. Tento pacient pravděpodobně nebude profitovat z nasazení léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu.

2789+5G>A/ dele2,3(21kb)

Analýza rektálních biopsií CF12 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (2,0 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má charakter organoidů pacienta s reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF12 neprokázala signifikantní bobtnání organoidů po přidání samotného potenciátoru či kombinace léčebných molekul. V případě tohoto pacienta nelze na základě naší predikce očekávat klinický benefit z léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu.

3. Pacienti s velmi vzácnými mutacemi CFTR genu

S955P/F508del

Analýza rektálních biopsií pacienta CF13 prokázala reziduální funkcí CFTR proteinu (~ 18 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů pacienta CF13 za bazálních podmínek má charakter organoidů s reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF13 prokázala signifikantní bobtnání po přidání kombinace VX-809/770 nebo VX-661/770. Míra bobtnání dosahuje v obou případech práh pro potenciální střední klinický benefit. Tento pacient by mohl profitovat z nasazení léčby Orkambi® nebo Symkevi®.

1717-2A>G/F508del

Analýza rektálních biopsií pacienta CF14 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (13 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů pacienta CF14 za bazálních podmínek má charakter organoidů s reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay pacienta CF14 prokázala signifikantní odpověď po přidání VX-770 i kombinace VX-809/VX-770 nebo VX-661/VX-770. Ani v jednom případě míra bobtnání nedosahuje prahu pro potenciální střední klinický benefit. Tento pacient pravděpodobně nebude klinicky profitovat z nasazení léčby dostupnými modulátory CFTR protein.

8. DISKUZE

V rámci našeho projektu jsme analyzovali vzorky od 14 pacientů, s celkem 9 různými mutacemi CFTR genu. S využitím nativní tkáně a buněčných kultur odvozených z nativní tkáně pacienta jsme potvrdili diagnózu CF u všech vyšetřovaných jedinců (ve 2 případech formu klasickou, ve 12 případech formu atypickou). Dále jsme se s využitím výše zmíněných experimentálních metod pokusili co nejpřesněji určit míru funkce CFTR proteinu jednotlivých pacientů a predikovat léčebnou odpověď na dostupné modulátory CFTR proteinu. Do první hodnocené skupiny byli zařazeni pacienti nesoucí mutace způsobující klasickou formu CF. Jednalo se o sourozeneckou dvojici nesoucí mutaci F508del v homozygotní konstituci. Známou skutečností je pozorovaná variabilita tíže fenotypu a reaktivity na léčebné molekuly u pacientů nesoucích tuto mutaci nejen v heterozygotní, ale také v homozygotní konstituci. Jako vysvětlení se nabízí role nekódujících variant v oblasti CFTR genu (Cutting, 2015; Vecchio-Pagán et al., 2016). Na mutaci F508del je také zaměřena největší pozornost v kontextu hledání možné farmakologické záchrany. V době našeho projektu byly pro pacienty nesoucí mutaci F508del v homozygotní konstituci schváleny ke klinickému využití dvě kombinace korektorů a potenciátorů (VX-809/770 – Orkambi® a VX-661/770 – Symkevi®). Analýzou nativní tkáně a buněčných kultur jsme potvrdili minimální reziduální funkci CFTR proteinu u obou pacientů. Přes minimální reziduální funkci prokázala FIS assay na intestinálních organoidech interindividuální variabilitu v reaktivitě na dostupné léčebné molekuly, klinický benefit z nasazení modulátorové léčby však nepředpokládáme ani v jednom případě. Do druhé hodnocené skupiny byli zařazeni pacienti s jednou či dvěma mutacemi, které vedou ke klinicky variabilnímu fenotypu onemocnění CF. Jedná o mutace vzácné (~1–4% incidence) a míra reziduální funkce CFTR proteinu je v těchto případech rozhodující nejen pro výsledný fenotyp onemocnění, ale také pro předpokládaný efekt dostupných léčebných molekul. V době našeho projektu byla pro pacienty nesoucí mutace s reziduální funkcí nejprve schválena léčba samotným potenciátorem (VX-770, Kalydeco®) (Durmowicz et al., 2018). V roce 2018 však byla u těchto pacientů nesoucích na druhé alele mutaci F508del prokázána vyšší efektivita nasazením kombinace korektoru s potenciátorem (VX-661/770, Symkevi®) (Rowe et al., 2017). Provedenými analýzami rektálních biopsií jsme u pacientů v této skupině prokázali velmi variabilní míru funkce CFTR proteinu (1,5–39,7 % funkce wt-CFTR), která odpovídala tíži klinických příznaků onemocnění. Dále jsme pomocí FIS assay provedli predikci možné reaktivity na dostupné

léčebné molekuly u jednotlivých pacientů. U celkem 5 pacientů již byla léčba přípravkem Symkevi® zahájena, její efekt zatím nelze vzhledem ke krátké době hodnotit. Ve všech případech se jednalo o pacienty nesoucí na druhé alele mutaci F508del. Léčba přípravkem Symkevi® byla v jednom případě nasazena i pacientovi, který nese na druhé alele mutaci jinou než F508del. Podpůrným argumentem k zahájení léčby byl v tomto případě i výsledek FIS assay na intestinálních organoidech, který ukazuje na možný vysoký klinický benefit pro pacienta. Jedná se další případ pacienta nesoucího dvě vzácné mutace CFTR genu, kterému byla léčba modulátory CFTR proteinu nasazena na základě individuální *ex vivo* predikce (Ramalho et al., 2021). Efekt léčby zatím nelze po 6 měsících jednoznačně hodnotit. Od jejího zahájení se však neobjevila žádná akutní exacerbace základního onemocnění a současně registrujeme zlepšení hodnot funkce plic. Do této skupiny byly opět zařazeny sourozenecké dvojice, na kterých jsme demonstrovali interindividuální variabilitu míry funkce CFTR proteinu a v některých případech i odlišnou reaktivitu na testované léčebné molekuly. I zde se jako vysvětlení nabízí role genetického pozadí (genů modifikujících CF) každého jednotlivého pacienta. Do poslední hodnocené skupiny jsme zařadili dva pacienty s ultra-vzácnými mutacemi. U prvního z nich jsme pomocí molekulárně genetického vyšetření identifikovali zcela novou a doposud nepopsanou mutaci CFTR genu (S955P). Vzhledem k hraniční hodnotě chloridů v potu, normální hodně fekální elastázy a mírným respiračním příznakům nebylo možné standardními metodami určit, zda se opravdu jedná o pacienta s CF. Analýza nativní tkáně pacienta prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (18 % funkce wt-CFTR), která však nedosahuje hodnoty zdravého jedince (více než 30 % funkce wt-CFTR). Analýzy provedené na buněčných kulturách (odvozených z vlastní tkáně pacienta a současně de novo vytvořených pomocí S955P-CFTR cDNA) prokázaly, že se v tomto případě jedná o mutaci vedoucí ke snížené pravděpodobnosti otevírání CFTR kanálku s jeho nižší stabilitou v buněčné membráně. S955P byla klasifikována jako mutace III/VI funkční třídy. Predikce odpovědi na přidané léčebné molekuly předpokládá střední klinický benefit z nasazení kombinace korektorů a potenciátorů (VX-809/770 – Orkambi® a VX-661/770 – Symkevi®). (Silva a Doušová et al., 2020) U druhého pacienta molekulárně genetické vyšetření prokázalo mutaci 1717-2A>G, jejíž klinický fenotyp ani efekt na tkáně pacienta zatím nebyl dostatečně popsán a kromě našeho pacienta byla tato mutace popsána pouze v jednom případě v Rumunsku (Popa et al., 1997). Náš pacient byl diagnostikován na základě novorozeneckého screeningu, měl zvýšenou koncentraci chloridů v potu, nízkou hodnotu elastázy ve stolici svědčící pro pankreatickou insuficienci a mírné respirační

příznaky. Analýza rektální biopsie sice prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (13 % funkce wt-CFTR), výsledky z provedené FIS assay však nesvědčí pro potenciální klinický benefit z nasazení léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu. (Silva a Doušová et al., 2020)

Součástí našeho projektu byly analýzy měření v Ussingově komůrce. V rámci mezinárodní kohorty pacientů s CF jsme porovnali parametr ($I_{sc} - I_{F/C}$), dosud užívaný jako zlatý standard k odlišení zdravých jedinců od pacientů s CF, s dalšími, které jsme extrahovali přímo ze záznamu měření na rektálních biopsiích. Tímto způsobem jsme identifikovali nový parametr, který vykazoval vyšší míru korelace s koncentrací chloridů v potu, hodnotou FEV1, FVC, BMI a hodnotou fekální elastázy. Tento parametr ($V_{I/F} + I_{F/C}$) odpovídá maximální aktivaci CFTR proteinu a koreluje lépe se závažností klinických příznaků onemocnění. (Silva et al., 2020) Je tedy využitelný k rozlišení pacientů s klasickou nebo mírnou formou CF a zdravých jedinců.

9. VZTAH PRÁCE K TESTOVANÝM HYPOTÉZÁM

Hypotéza č.1: FIS a ICM představují experimentální *ex vivo* modely využitelné ke zhodnocení míry funkce CFTR proteinu u (i) pacientů se dvěma mutacemi způsobujícími klasickou formu CF (ii) pacientů s jednou či dvěma vzácnými mutacemi způsobujícími variabilní fenotyp onemocnění a mírnou formu CF (iii) pacientů s nejasnou diagnózou CF na základě nejednoznačných výsledků potního testu a/nebo molekulárně genetického vyšetření.

V naší práci byla hypotéza potvrzena. Pomocí *ex vivo* experimentálních modelů jsme determinovali míru funkce CFTR proteinu jednotlivých pacientů odpovídající klinickému fenotypu onemocnění. Dále jsme pomocí experimentálních metod charakterizovali *de novo* mutaci CFTR genu s doposud nejasnou kauzalitou k onemocnění CF.

Hypotéza č.2: FIS assay na intestinálních organoidech lze využít k identifikaci responderů na dostupné modulátory CFTR proteinu.

V naší práci byla tato hypotéza potvrzena. Pomocí FIS assay jsme identifikovali respondery a současně i non-respondery na dostupné modulátory CFTR proteinu.

10. ZÁVĚRY

Prezentované výsledky v této práci byly získány zhodnocením originálních dat, publikovaných i dosud nepublikovaných, která byla získána analýzou rektálních biopsií a případně z nich vytvořených kultur intestinálních organoidů. Práce byla zaměřena na individuální určení míry funkce CFTR proteinu a *ex vivo* predikci léčebné odpovědi na dostupné modulátory CFTR proteinu. S využitím experimentálních *ex vivo* metod jsme určili míru funkce CFTR proteinu pacientů nesoucích kombinaci celkem 9 různých mutací CFTR genu. Jednalo se o pacienty s klasickou formou CF, u kterých jsme potvrdili minimální reziduální funkci CFTR proteinu s interindividuální variabilitou. Dále jsme u pacientů s mutacemi s klinicky variabilním fenotypem prokázali různou míru reziduální funkce CFTR proteinu (1,5–39,7 % funkce wt-CFTR). Podařilo se nám funkčně charakterizovat doposud nepopsanou mutaci CFTR genu a potvrdit diagnózu CF u pacienta nesoucího tuto *de novo* mutaci, jehož diagnóza nebyla doposud na základě standardních diagnostických metod jednoznačná. Provedli jsme *ex vivo* predikci možné klinické odpovědi na dostupné modulátory CFTR proteinu a identifikovali potenciální respondery v celkem 8 případech a současně non-respondery v celkem 5 případech. K potvrzení *ex vivo* predikce bude zapotřebí delší prospektivní sledování pacientů po nasazení modulatorové léčby. Široké spektrum mutací CFTR genu zahrnuje více nebo méně vzácné varianty. Každá z těchto variant postihuje celosvětově pouze malou skupinu jedinců, proto je v těchto případech velkou výzvou nejen diagnostika samotného onemocnění, ale současně i predikce možného léčebného potenciálu již dostupných modulatorů CFTR proteinu. Jako alternativa ke klasickým klinickým studiím se v posledních letech objevují přístupy, které využívají buněčné modely odvozené z vlastní tkáně pacienta k predikci individuální *ex vivo* léčebné odpovědi na modulátory CFTR proteinu. V rámci tohoto alternativního systému by mohly být již klasifikované i doposud neklasifikované varianty přiřazeny do určitých terapeutických skupin. Selektce nejvhodnější kombinace léků pro jednotlivé skupiny (tzv. ‘theranostika’) by mohla představovat způsob, jakým by se k nejlepší možné kombinaci léčebných molekul dostali pacienti nesoucí častější mutace CFTR genu (jako např. F508del), ale také pacienti nesoucí mutace velmi vzácné. Tento systém by mohl vytvořit základ pro maximálně efektivní, personalizovanou léčbu co nejširší skupiny pacientů s CF a translaci výzkumu do klinické praxe.

11. CONCLUSIONS

The results presented in this work were obtained by evaluating the original data, published and unpublished, which was obtained by analysis of rectal biopsies and cultures of intestinal organoids. The work was focused on individual determination of the degree of CFTR protein function and *ex vivo* prediction of the therapeutic response to available CFTR modulators. Using experimental *ex vivo* methods, we determined the degree of CFTR protein function in patients carrying a combination of a total of 9 different mutations in the CFTR gene. These were patients with the classic form of CF, in whom we confirmed minimal residual function of the CFTR protein with interindividual variability. Furthermore, in patients with mutations with a clinically variable phenotype, we demonstrated varying degrees of residual CFTR protein function (1.5–39.7% of wt-CFTR function). We were able to functionally characterize the as yet undescribed mutation of the CFTR gene and confirm the diagnosis of CF in a patient carrying this *de novo* mutation, whose diagnosis has been inconclusive based on standard diagnostic methods. We performed *ex vivo* prediction of a possible clinical response to available CFTR modulators and identified potential responders in a total of 8 cases and non-responders in a total of 5 cases. Longer prospective follow-up of patients after initiation of CFTR modulator therapy will be required to confirm our prediction. The broad spectrum of CFTR gene mutations includes more or less rare variants. Each of these variants affects only a small group of individuals worldwide, in these cases the big challenge is not only the diagnosis of the disease itself, but also the prediction of the possible therapeutic potential of available CFTR modulating drugs. As an alternative to conventional clinical trials, approaches have emerged in recent years that use cell models derived from patient's own tissue to predict individual *ex vivo* response to CFTR modulators. Within this alternative system, already classified and as yet unclassified variants could be assigned to certain therapeutic groups. Selecting the most appropriate combination of drugs for each group (so-called ‘theranostics’) could help to get the best possible combination of treatment not only for patients carrying more frequent mutations (such as F508del), but also for patients carrying very rare mutations in CFTR gene. This system could form the basis for the most effective, personalized treatment of the widest possible group of CF patients and the translation of research into clinical practice.

12. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Shteinberg M, Haq IJ, Polineni D, Davies JC. Cystic fibrosis. *Lancet* 2021; 397:2195–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32542-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32542-3).
- [2] Boeck K. De, Amaral MD. Rapid Review Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016; 2006:1–13. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-0).
- [3] CFTR2.org | CFTR2 n.d. <https://cftr2.org/> (accessed May 23, 2020).
- [4] Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol* 2020;10:1–29. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01662>.
- [5] Cutting G. R. Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015; 16:45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>.
- [6] Farrell P. M., White T. B., Ren C. L., Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017; 181:S4-S15.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>.
- [7] Farrell P. M., Rosenstein B. J., White T. B., Accurso F. J., Castellani C., Cutting G. R., et al. Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr* 2008; 153. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.05.005>.
- [8] Sermet-Gaudelus I., Girodon E., Sands D., Stremmler N., Vavrova V., Deneuville E., et al. Clinical phenotype and genotype of children with borderline sweat test and abnormal nasal epithelial chloride transport. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:929–36. <https://doi.org/10.1164/rccm.201003-0382OC>.
- [9] Derichs N., Sanz J., Von Kanel T., Stolpe C., Zapf A., Tümmler B., et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax* 2010; 65:594–9. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.125088>.
- [10] Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: Shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. *Front Pharmacol* 2016; 7:1–20. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00275>.
- [11] Rowe S. M., Daines C., Ringshausen F. C., Kerem E., Wilson J., Tullis E., et al. Tezacaftor–ivacaftor in residual-function heterozygotes with cystic fibrosis. *N Engl*

- J Med 2017; 377:2024–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709847>.
- [12] Wainwright C. E., Elborn J. S., Ramsey B. W., Marigowda G., Huang X., Cipolli M., et al. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del *CFTR*. *N Engl J Med* 2015; 373:220–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409547>.
- [13] Davies J. C., Moskowitz S. M., Brown C., Horsley A, Mall M. A., McKone E. F., et al. VX-659–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med* 2018; 379:1599–611. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807119>.
- [14] Middleton P. G., Mall M. A., Dřevínek P., Lands L. C., McKone E. F., Polineni D., et al. Elexacaftor-tezacaftor-ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *N Engl J Med* 2019; 381:1809–19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1908639>.
- [15] Amaral M. D., de Boeck K., Amaral M., Davies J. C., Drevinek P., Elborn S., et al. Theranostics by testing CFTR modulators in patient-derived materials: The current status and a proposal for subjects with rare CFTR mutations. *J Cyst Fibros* 2019; 18:685–92. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.06.010>.
- [16] Clancy J. P., Cotton C. U., Donaldson S. H., Solomon G. M., VanDevanter D. R., Boyle M. P., et al. CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros* 2019; 18:22–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.004>.
- [17] Mall M., Hirtz S., Gonska T., Kunzelmann K.. Assessment of CFTR function in rectal biopsies for the diagnosis of cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2004; 3:165–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.035>.
- [18] Hirtz S., Gonska T., Seydewitz H. H., Thomas J., Greiner P., Kuehr J., et al. CFTR Cl⁻ channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127:1085–95. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.07.006>.
- [19] Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 2016;165:1586–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.
- [20] de Winter-De Groot KM, Janssens HM, van Uum RT, Dekkers JF, Berkers G, Vonk A, et al. Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as a biomarker of CFTR function. *Eur Respir J* 2018;52. <https://doi.org/10.1183/13993003.02529-2017>.
- [21] Sousa M., Servidoni M. F., Vinagre A. M., Ramalho A. S., Bonadia L. C., Felício V., et al. Measurements of CFTR-Mediated Cl⁻ Secretion in Human Rectal Biopsies

- Constitute a Robust Biomarker for Cystic Fibrosis Diagnosis and Prognosis. *PLoS One* 2012; 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047708>.
- [22] Dekkers J. F., Berkers G., Kruisselbrink E., Vonk A., Jonge H. R. De, Janssens H. M., et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2016; 8:13. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad8278>.
- [23] Dekkers J. F., Wiegerinck C. L., de Jonge H. R., Bronsveld I., Janssens H. M., de Winter-de Groot K. M., et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 2013; 19:939–45. <https://doi.org/10.1038/nm.3201>.
- [24] Durmowicz A. G., Lim R., Rogers H., Rosebraugh C. J., Chowdhury B. A. The U.S. food and drug administration’s experience with ivacaftor in cystic fibrosis: Establishing efficacy using in vitro data in lieu of a clinical trial. *Ann Am Thorac Soc* 2018; 15:1–2. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201708-668PS>.
- [25] Popa I., Pop L., Popa Z., Schwarz M. J., Hambleton G., Malone G. M., et al. Cystic fibrosis mutations in Romania. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 212–3. <https://doi.org/10.1007/s004310050586>.
- [26] Vecchio-Pagán B., Blackman S. M., Lee M., Atalar M., Pellicore M. J., Pace R. G., et al. Deep resequencing of CFTR in 762 F508del homozygotes reveals clusters of non-coding variants associated with cystic fibrosis disease traits. *Hum Genome Var* 2016; 3:1–9. <https://doi.org/10.1038/hgv.2016.38>.
- [27] Ramalho A. S., Förstová E., Vonk A. M., Ferrante M., Verfailli C., Dupont L., et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2021; 57. <https://doi.org/10.1183/13993003.02426-2019>.
- [28] Silva IAL, Doušová T, Ramalho S, Centeio R, Clarke LA, Railean V, et al. Organoids as a personalized medicine tool for ultra-rare mutations in cystic fibrosis: The case of S955P and 1717-2A>G. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2020; 1866. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165905>.
- [29] Silva IAL, Duarte A, Marson FAL, Centeio R, Doušová T, Kunzelmann K, et al. Assessment of Distinct Electrophysiological Parameters in Rectal Biopsies for the Choice of the Best Diagnosis/Prognosis Biomarkers for Cystic Fibrosis. *Front Physiol* 2020;11:1735. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.604580>.

13. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem dizertace

Silva I. A. L.*, **Doušová T.***, Ramalho S., Centeio R., Clarke L. A., Railean V., et al. *Organoids as a personalized medicine tool for ultra-rare mutations in cystic fibrosis: The case of S955P and 1717-2A>G*. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2020;1866. **IF 4,352**

* both autors contributed equally to this work

Silva I. A. L., Duarte A., Marson F. A. L., Centeio R., **Doušová T.**, Kunzelmann K., et al. *Assessment of Distinct Electrophysiological Parameters in Rectal Biopsies for the Choice of the Best Diagnosis/Prognosis Biomarkers for Cystic Fibrosis*. *Front Physiol* 2020;11:1735. **IF 3,367**

Furstova E., **Dousova T.**, Beranek J., Libik M., Fila L., Modrak M., Cinek O., Macek M. Jr, Drevinek P. *Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis*. *J Cyst Fibros*. 2021 Aug 1:S1569-1993(21)01304-7. Epub ahead of print. **IF 5,482**

Původní vědecké práce in extenso s částečným vztahem k tématu dizertace nebo bez vztahu k tématu dizertace

S impact factorem

Centeio R., Ousingsawat J., Cabrita I., Schreiber R., Talbi K., Benedetto R., **Doušová T.**, Verbeken E., Boeck K., Cohen I., Kunzelmann K.. Mucus Release and Airway Constriction by TMEM16A May Worsen Pathology in Inflammatory Lung Disease. *Int J Mol Sci* 2021;22:7852. **IF 5,54**

Quaresma M. C., Pankonien I., Clarke L. A., Sousa L. S., Silva I. A. L., Railean V., **Doušová T.**, Fuxe J., Amaral M. D. Mutant CFTR Drives TWIST1 mediated epithelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis.* 2020 Oct 26;11(10):920. **IF 6,304**

Doušová T., Plešková J., Chmelařová A. Pulmonary management of spinal muscular atrophy, *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2020, 83(S2):35-40, **IF 0,350**

Rohlenová M., Machová K., Stará V., Hedvičáková P., Zieg J., **Doušová T.**, Fajkusová L., Venclová-Žáčková J., Souček O., Haberlová J., Characteristics of a cohort of boys with duchenne and becker muscular dystrophies – a study from a single neuromuscular centre, *Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2020, 83(3) 305-314, **IF 0,350**

Koucký V., Uhlík J., Hoňková L., Koucký M., **Doušová T.**, Pohunek P. Ventilation Inhomogeneity and Bronchial Basement Membrane Changes in Chronic Neutrophilic Airway Inflammation. *Chest.* 2020 Apr;157(4):779-789. **IF 8,308**

Kunzelmann K., Ousingsawat J., Cabrita I., **Doušová T.**, Bähr A., Janda M., et al. TMEM16A in Cystic Fibrosis: Activating or Inhibiting? *Front Pharmacol* 2019;10. **IF 4,225**

Neumannová K., **Doušová T.**, Sedlák V., Zatloukal J., Kos S., Zatloukal J. Doporučený postup České pneumologické a ftizeologické společnosti a České společnosti dětské pneumologie pro dlouhodobou domácí léčbu poruch expektorace pomocí přístroje CoughAs sist. *Ces a Slov Neurol a Neurochir* 2017;80:480–4. **IF 0,377**

Španěl P., Sovová K., Dryahina K., **Doušová T.**, Dřevínek P., Smith D. Do linear logistic model analyses of volatile biomarkers in exhaled breath of cystic fibrosis patients reliably indicate *Pseudomonas aeruginosa* infection? J Breath Res 2016;10:036013. **IF 4,454**

Smith D., Sovová K., Dryahina K., **Doušová T.**, Dřevínek P., Španěl P. Breath concentration of acetic acid vapour is elevated in patients with cystic fibrosis. J Breath Res 2016;10:021002. **IF 4,545**

Španěl P., Sovová K., Dryahina K., **Doušová T.**, Dřevínek P., Smith D. Acetic acid is elevated in the exhaled breath of cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2016:1–2. **IF 4,768**

Bez impact factoru

David J., **Doušová T.**, Malec J. Význam vyšetření očního pozadí u akutních stavů v pediatrii. Česko-slovenská Pediatrie. Praha, 2021, 76(1), 63-65

Doušová T., David J., Špičáková K., Koubský K., Koukolská V., Jansa P. Eisenmengerův syndrom a jeho komplikace v dětském věku. Česko-slovenská Pediatrie. Praha, 2020, 75(3), 178-182.

Doušová T., Děti závislé na technické podpoře dýchání. Česko-slovenská pediatrie. Praha, 2020, 75(7), 421-425

Koucký V., Skalická V., Bartošová J., **Doušová T.**, Vávrová V., Pohunek P. Funkce plic souboru českých kojenců a batolat s cystickou fibrózou. Česko-slovenská pediatrie. Praha, 2019, 74(7), 392-400

Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních

Doušová et al. Cystická fibróza jako model nových poznání a moderní péče o chronické respirační onemocnění v 21. století, Konference dětské pneumologie 2018, Praha

Doušová et al. Neinvazivní ventilační podpora u dětí, Konference české pneumologické a ftizeologické společnosti ČLS JEP 2018, Plzeň

Doušová et al. Nové terapie cystické fibrózy, Kongres českých pediatriů a sester 2018, Praha

Doušová et al. Lung Transplantation in Children and Young Adults in Czech Republic: A Single Center Experience, prezentováno na konferenci ISHLT 2018, Nice

Doušová et al. Transplantace plic u dětí, Kongres společnosti pro orgánové transplantace ČLS JEP, Špindlerův Mlýn, 2018

Kapitoly v monografiích

Pohunek P, Doušová T. Biologická léčba astmatu. Biologická léčba v pediatrii, Motolské pediatrické semináře 8, Galén, 2021, strany 79 - 83

Doušová T. Plicní komplikace u dětské mozkové obrny. Dětská mozková obrna, Mezioborový přístup, Motolské pediatrické semináře 7, Galén, 2020, strany 119 - 125

Doušová T., Fürstová E., Dřevínek P. Nové terapie cystické fibrózy. Vzácná onemocnění u dětí, Motolské pediatrické semináře 2, Galén, 2018, strany 53 - 59

Doušová T., Havlín J, Lischke R. Transplantace plic u dětí. Orgánové transplantace u dětí, Motolské pediatrické semináře 1, Galén, 2018, strany 15 - 27

Doušová T., Pohunek P. Diferenciální diagnostika dušnosti u dětí. Dušnost: problém mnoha oborů, Mladá Fronta, 2015, strany 51 - 64