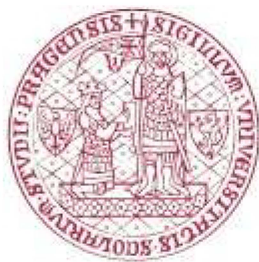


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Tereza Doušová

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

New approaches to determination pathophysiological changes in patients
with cystic fibrosis

Disertační práce

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

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

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 12.07.2021

Tereza Doušová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Pavlu Dřevínkovi, PhD., bez kterého by tento projekt nevznikl. Za vše, co mě v průběhu mého postgraduálního studia naučil a zejména za jeho vstřícný přístup a neutuchající entuziasmus, který je pro mě velkou inspirací. Dále bych ráda poděkovala Iris Silva, PhD., bez jejíž pomoci by nebylo možné provést laboratorní část projektu. Poděkování patří i prof. Margaridě Amaral, která mi umožnila pobyt v laboratoři Univerzity v Lisabonu a osvojení všech laboratorních metod použitých v rámci projektu, doc. MUDr. Liboru Filovi PhD. a prof. Karlu Kunzelmannovi za cenné rady a Raquel Centeio za spolupráci na laboratorní práci. V neposlední řadě patří poděkování mému partnerovi, za podporu a životní harmonii.

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.

Klíčová slova: cystická fibróza, modulátory CFTR proteinu, intestinální organoidy, personalizovaná péče

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.

Keywords: cystic fibrosis, CFTR modulators, intestinal organoids, personalized treatment

Seznam použitých zkratek a symbolů

ABC – ATP-binding cassette
ASL – tekutina na povrchu respiračního epitelu
ADP – adenosindifosfát
ATP – adenosintrifosfát
AUC – plocha pod křivkou
BMI – index tělesné hmotnosti
cAMP – cyklický adenosinmonofosfát
CBAVD – vrozená oboustranná absence vas deferens
CCH – karbachol
CF – cystická fibróza
CFLD – jaterní onemocnění vázané na cystickou fibrózu
CFRBD – kostní nemoc vázaná na cystickou fibrózu
CFRD – diabetes vázaný na cystickou fibrózu
CFTR – transmembránový regulátor vodivosti
CO₂ – oxid uhličitý
DIOS – distální intestinální obstrukční syndrom
DMSO – dimethylsulfoxid
EDTA – ethylendiaminotetraoctová kyselina
EMA – Evropská léková agentura
ENaC – epiteliální sodíkový kanál
ER – endoplazmatické reticulum
FBS – fetální bovinní sérum
FEE-1 – fekální elastáza 1
FEV₁ – objem vzduchu během usilovného výdechu za 1s
FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FIS – forskolinem indukované bobtnání organoidu
Fsk – forskolin
FVC – funkční vitální kapacita
HBE – buňky odvozené z lidského respiračního epitelu
I/F – IBMX/Fsk
IBMX – 3-isobutyl-1-metylxantin
ICM – transepiteliální rozdíl napětí na rektální sliznici
I_(eq-sc) – ekvivalent proudu v zavřeném okruhu
IRT – imunoreaktivní trypsinogen
KH₂PO₄ – fosforečnan draselný
MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza
mRNA – messenger RNA
NaCl⁻ – chlorid sodný
NBD – nukleotidy vázající doména
NBS – novorozenecký screening
NPD – transepiteliální rozdíl napětí na nosní sliznici
PBS – fosfátový pufr
PI – pankreatická insuficience
PS – pankreatická suficience
RD – regulační doména
TMD – transmembránová doména
PBS – fetální bovinní sérum
PKA – proteinkináza A

R_{te} – transepiteliální rezistence

V_{te} – transepiteliální napětí

wt – zdravá kontrola

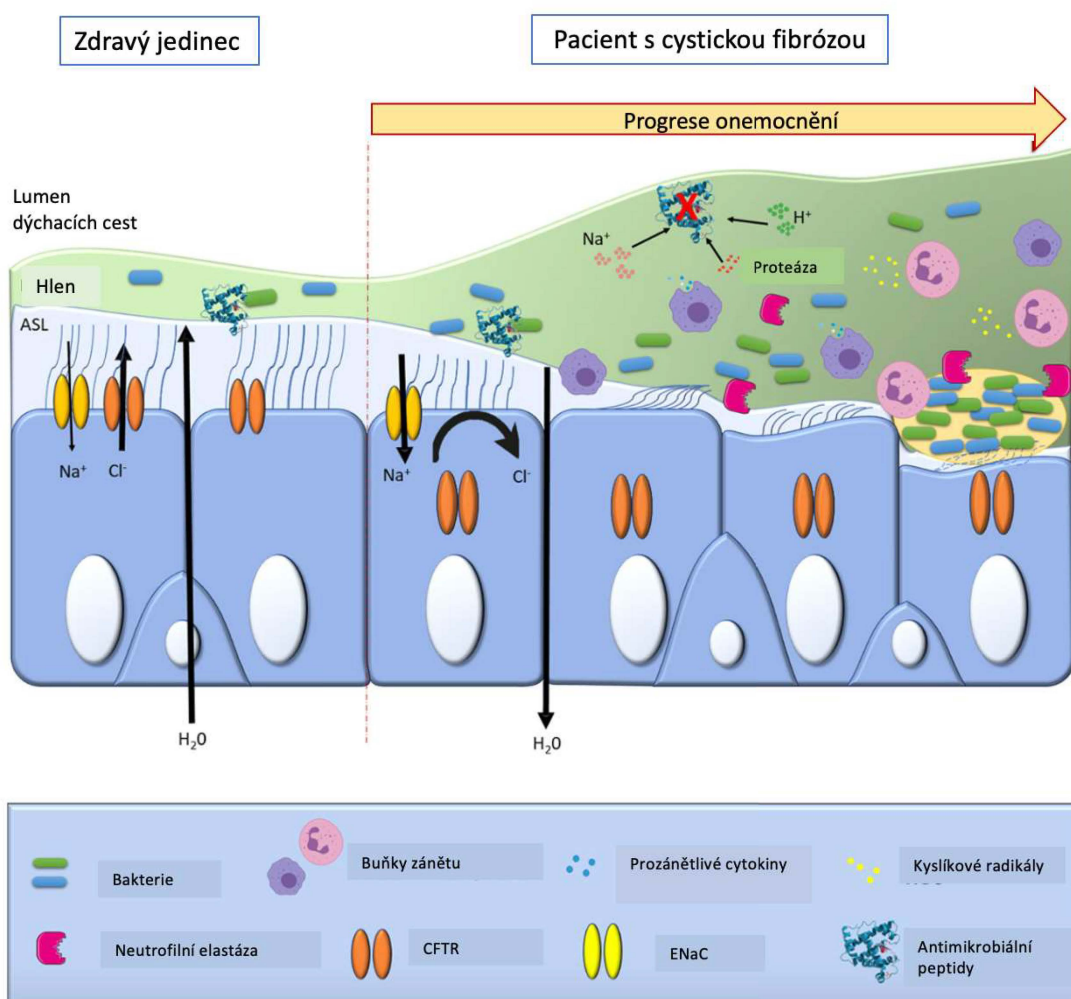
1. OBSAH	
1. OBSAH	8
2. ÚVOD.....	10
2.1. Cystická fibróza	10
2.2. CFTR.....	12
2.3. Funkční klasifikace mutací CFTR genu.....	14
2.4. Standardní diagnostika CF a dostupné biomarkery funkce CFTR proteinu.....	16
2.4.1. Potní test a NPD.....	17
2.4.2. Molekulárně genetické vyšetření CFTR genu.....	17
2.4.3. Novorozenecký screening.....	17
2.4.4. Fekální elastáza-1	18
2.5. Kauzální léčba CF	18
2.6. Orphan mutace	20
2.6.1. Theranostika, theratypy a jejich definice	20
2.7. Ex vivo modely.....	22
2.7.1. Měření rozdílu elektrického napětí na rektální biopsii v Ussingově komůrce	22
2.7.2. Intestinální organoidy a forskolinem indukované bobtnání organoidu	24
3. CÍL PRÁCE.....	27
4. VĚDECKÁ HYPOTÉZA	29
5. MATERIÁL A METODY.....	30
5.1. Analýza funkce CFTR proteinu.....	30
5.1.1. Rektální biopsie	30
5.2. Statistická analýza	32
6. VÝSLEDKY	33
6.1. Pacienti, analyzované vzorky.....	33
6.2. Pacienti s klasickou formou CF.....	34
6.2.1. F508del/F508del	34
6.3. Pacienti s jednou/dvěma vzácnými mutacemi a variabilním fenotypem CF	36
6.3.1. D1152H/F508del nebo jiná.....	36
6.3.2. 3849 + 10kbC>T/F508del nebo jiná.....	40
6.3.3. 2789+5G>A/F508del nebo jiná.....	45
6.4. Pacienti s velmi vzácnými mutacemi	49
6.4.1. S955P/F508del	49
6.4.2. 1717-2A>G/F508del	50
7. DISKUZE	53
8. VZTAH PRÁCE K TESTOVANÝM HYPOTÉZÁM	65
9. ZÁVĚR	66

10. SOUHRN	67
11. SUMMARY	71
12. LITERATURA:	74
13. PŘÍLOHA Č. 1 – SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	82

2. ÚVOD

2.1. Cystická fibróza

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. CFTR (blíže viz kap. 1.2.) se jako představitel cAMP regulovaného iontového kanálku podílí mimo transportu chloridových iontů na přenosu dalších látek jako např. bikarbonát (Kunzelmann et al., 2017). Vedle své hlavní funkce hraje také podstatnou roli v regulaci dalších iontových kanálků, zejména epiteliálního natriového kanálku (ENaC), jehož aktivita je proteinem CFTR tlumena (Stutts et al., 1995). V případě CF tak dochází vlivem dysfunkce CFTR proteinu ke zvýšení aktivity ENaC a k hyperabsorbci sodíkových iontů (sekundárně i vody), což vede především k zahuštění tekutiny na povrchu sliznice dýchacích cest (Elborn, 2016). CF je multisystémové onemocnění, které se manifestuje v orgánech a tkáních s expresí CFTR v apikální membráně epitelových buněk (mimo dýchací cesty například také gastrointestinální trakt, reprodukční orgány a potní žlázy). Život limitujícím je především plicní postižení, které se v největší míře podílí na zvýšené morbiditě a mortalitě pacientů. Dysfunkce CFTR proteinu společně s nadměrným transportem sodíkových iontů dovnitř buňky vedou k již zmíněné nedostatečné hydrataci tekutiny na povrchu respiračního epitelu (ASL – airway surface liquid). Zvýšená hustota ASL má za následek stagnaci hlenu společně s chronickou infekcí dýchacích cest bakteriemi. Na zvýšené viskozitě hlenu se mimo chronického zánětu podílí i narušená sekrece bikarbonátu dysfunkčním CFTR kanálkem, který zvyšuje kyselost ASL. Důsledkem kyselého pH je také inhibice aktivity antimikrobiálních peptidů, které jsou v ASL za normálních podmínek přítomny (Haq et al., 2016; Mitri et al., 2020). Chronické zánětlivé změny vedou k progresivnímu poškození plicní tkáně a v konečném stadiu k selhání funkce respiračního systému (Obr. 2.1).



Obr. 2.1 Patofyziologie vzniku plicního postižení u CF. U zdravého jedince určuje transport sodíkových (Na^+) a chloridových (Cl^-) iontů míru hydratace ASL. V případě pacienta s CF je díky absenci nebo nedostatečné funkci CFTR proteinu narušen transport Cl^- vedoucí k neregulované absorpci Na^+ . Výsledkem je nedostatečná hydratace ASL a narušení mukociliární clearance s postupným hromaděním hustého hleny v dýchacích cestách. V tomto prostředí přezívají bakterie tvořící biofilm, dochází k sekreci prozánětlivých cytokinů, migraci polymorfonukleárních neutrofilů s uvolněním kyslíkových radikálů a proteáz. Jejich zvýšená koncentrace a kyselost ASL mají negativní vliv na působení řady antimikrobiálních peptidů. **Upraveno dle (Mitri et al., 2020).**

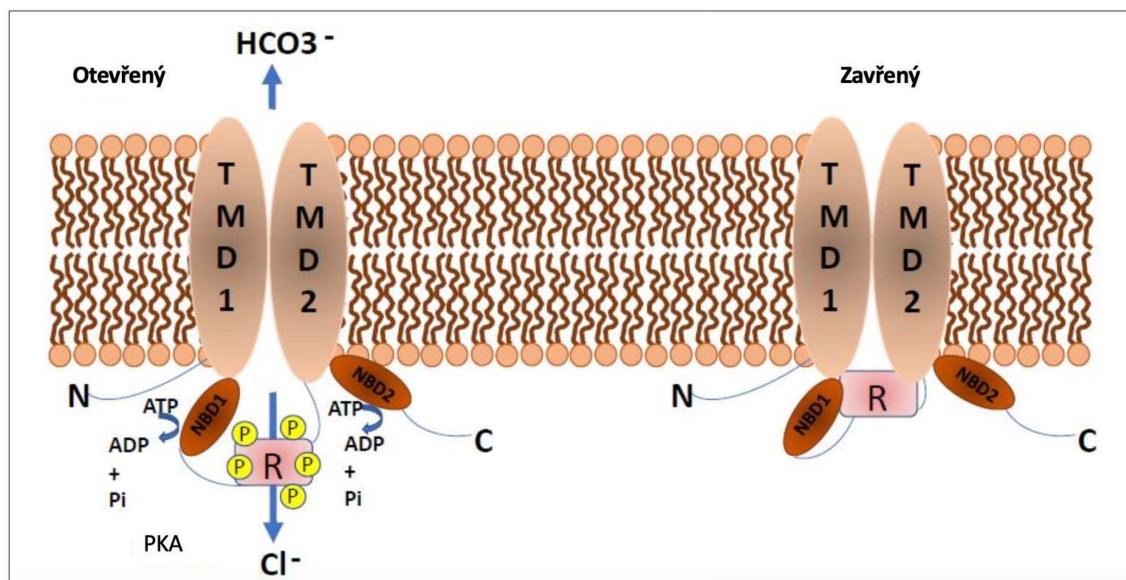
Mezi další postižené orgány řadíme v případě CF slinivku břišní. Chronická obstrukce vývodných kanálků s jejich následným jizvením, vznikem fibrózy a cystickou přestavbou tkáně vedou v konečném důsledku ke ztrátě exokrinní funkce. Rozsáhlejší destrukce včetně Langerhansových ostrůvků je příčinou vzniku diabetu mellitu (CFRD – cystic fibrosis related diabetes). Insuficience zevní sekrece pankreatu má současně za následek steatoreu, neprospívání a podílí se na rozvoji osteoporózy (CFRBD – cystic fibrosis related bone disease). Kromě malnutrice dochází k nedostatečnému vstřebávání vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Hepatobiliární postižení vede především k fibróze až cirhóze jater (CFLD – cystic fibrosis related liver disease) a cholelithiáze. U pacientů se v průběhu života

objevuje syndrom obstrukce distálního střeva (DIOS – distal intestinal obstruction syndrome), jenž je ekvivalentem mekoniového ileu v novorozeneckém věku. Obstrukce vas deferens v embryonálním vývoji s jejich zánikem (CBAVD – congenital bilateral absence of vas deferens) vede k infertilitě u mužů v dospělém věku. V potních žlázách vede narušený mechanismus reabsorbce NaCl k nadměrné ztrátě chloridů spojené s dehydratací a deplecí iontů (Houwen et al., 2010; Wilschanski, Novak., 2013; Kunzelmann et al., 2017; Kamal et al., 2018). Prognóza pacientů ve 30. letech 20. století, kdy byla CF poprvé popsána, představovala úmrtí často již v kojeneckém nebo časném dětském věku (Andersen, 1938). V současnosti se medián přežití pro pacienty narozené po roce 2000 v rozvinutých zemích odhaduje na více než 40 let věku (Cystic Fibrosis Trust, 2016; Cystic Fibrosis Foundation, 2018). Prodloužení délky a kvality života je spojeno zejména s pokroky ve včasné zahájené symptomatické terapii (pankreatické enzymy, mukolytika, antibiotika), která navazuje na včasné stanovení diagnózy (často na principu novorozeneckého screeningu) (Elborn et al., 1991; De Boeck a Amaral, 2016).

2.2. CFTR

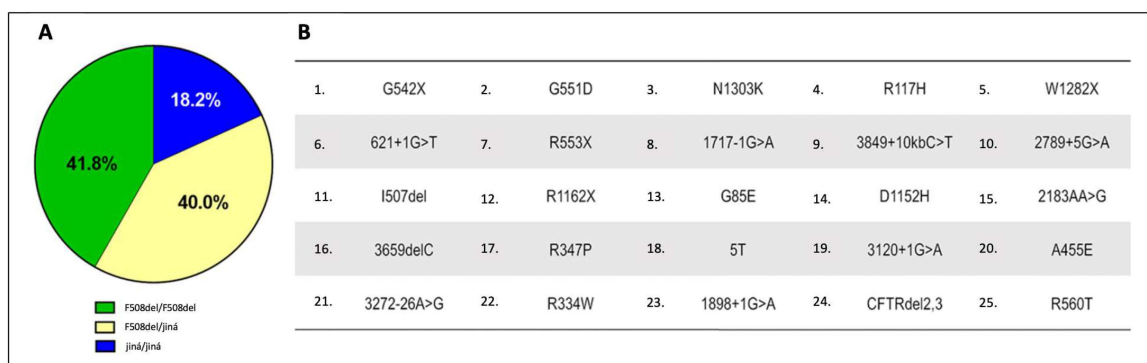
CFTR lokalizovaný na dlouhém (q) raménku 7. chromozomu, je jedním z největších genů lidského genomu (Johns Hopkins University, 2016). Zaujímá 190 kb genomické DNA a kóduje přibližně 6,5 kb mRNA (složené z 27 exonů), přepisující se do aminokyselinového transmembránového glykoproteinu o molekulární hmotnosti 170 kDa (Tsui a Dorfman, 2013). CFTR je členem rodiny tzv. ABC transportérů (ATP Binding Casette), které za normálních podmínek aktivně přenášejí proti koncentračnímu gradientu substráty přes buněčné membrány. Tento protein se skládá ze dvou transmembránových domén (membrane spanning domain, MSD1/2) tvořících pór kanálku, a dále ze dvou nukleotidy vázajících domén (NBD1/2), které váží a hydrolyzují ATP. Unikátní pro CFTR je tzv. regulační doména (RD), která spojuje obě poloviny kanálku a jejíž fosforylace je nezbytná k jeho otevření (Dorwart et al., 2004). (Obr. 2.2) Biogeneze CFTR je zahájena syntézou s následným získáním správné konformace v endoplazmatickém retikulu (ER), kde dochází k jeho glykosylaci. Po řádném sbalení (folding) a kontrolou kvality proteinu v endoplazmatickém retikulu putuje stále ještě nezralý CFTR do Golgiho komplexu. Zde po dalším zpracování dosahuje zralé, plně glykosylované formy a je dopraven do plazmatické membrány (Farinha a Canato, 2017). Na rozdíl od ostatních členů rodiny ABC transportérů je CFTR jediným proteinem, který plní funkci iontového kanálku přenosem iontů ve směru

jejich koncentračního gradientu. K otevření kanálku vede po aktivaci proteinkinázy A (PKA), fosforylaci R domény a vazbě ATP dimerizace nukleotidy vázajících domén. K jeho uzavření dochází prostřednictvím hydrolýzy ATP (Cant et al., 2014).



Obr. 2.2 Schematické zobrazení struktury a aktivace CFTR proteinu. CFTR protein se skládá z 5 domén: 2 transmembránových domén (TMD1/2), 2 nukleotidy vázajících domén (NBD1/2) a 1 regulační domény (RD). Otevření kanálku zahájí změna konformace, která následuje po vazbě ATP na obě NBD. Fosforylace RD prostřednictvím proteinkinázy A (PKA) vede k aktivaci kanálku a transportu iontů. ADP – adenosindifosfát, ATP – adenosintrifosfát, Pi – anorganický fosfát, Cl⁻ – chloridové ionty. **Upraveno dle Bouhamdan et al., (2018).**

Podmínkou vzniku onemocnění CF je přítomnost mutací CFTR genu na obou alelách (pacient je homozygotem nebo složeným heterozygotem pro danou mutaci). 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, ©2011-2020). Databáze CFTR2 dále eviduje k 31.07.2020 48 variant s variabilním klinickým dopadem, 23 variant bez prokázané kauzality se vznikem onemocnění CF a celkem 11 variant s doposud nejasným klinickým významem (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) (Obr. 2.3).



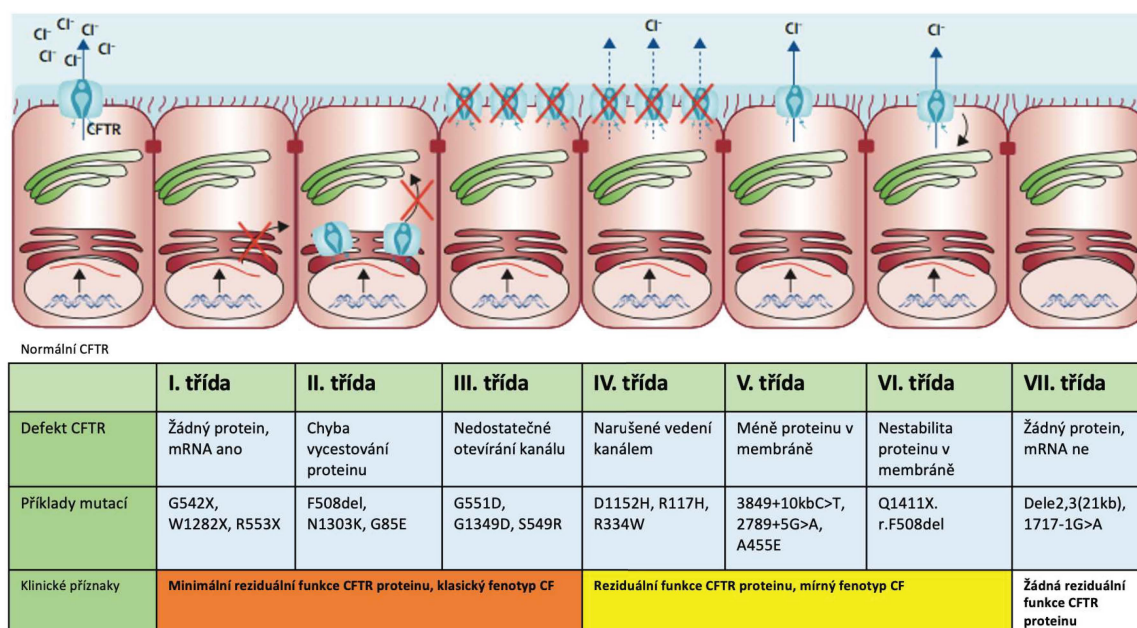
Obr. 2.3 Distribuce mutací CFTR proteinu. (A) Globální prevalence mutací dle genotypů: F508del v homozygotní konstituci (F508del/F508del), F508del v heterozygotní konstituci (F508del/jiná) a genotypy složené z jiných než F508del mutací (jiná/jiná). (B) 25 nejčastěji se vyskytujících non-F508del mutací v rámci celosvětové populace pacientů s CF. **Upraveno dle Lopes-Pacheco (2020).**

Situace se neliší v České republice, kde je mutace F508del přítomná u více než 85 % pacientů. Následuje CFTRdele2,3 („slovanská mutace“) s 11 % a G542X s 5 % (European Cystic Fibrosis Society, 2017; Český registr cystické fibrózy, 2020). Mutace označené jako způsobující CF vedou obecně k narušenému transportu chloridových iontů a bikarbonátu na membránách epitelových buněk. Závažnost onemocnění je však do velké míry odvozena od mechanismu, kterým je tvorba a funkce CFTR proteinu narušena. Pochopení tohoto mechanismu se stalo zcela zásadním i s ohledem na vývoj nových léčebných molekul označovaných jako modulátory CFTR proteinu (blíže viz kap. 2.5.). Tyto molekuly cílí na molekulární podstatu defektu CFTR a vedly ke změně přístupu v léčbě CF od čistě symptomatického k tzv. nemoc modifikujícímu přístupu, který je specifický pro jednotlivé typy mutací (De Boeck a Amaral, 2016; Veit et al., 2016).

2.3. Funkční klasifikace mutací CFTR genu

Všechny mutace CFTR genu vedou v konečném důsledku k narušení přenosu iontů na apikální membráně epitelových buněk. Mechanismus, kterým jednotlivé mutace zasahují do tvorby nebo funkce CFTR proteinu, a tím ovlivňují i výsledný fenotyp onemocnění, se však liší. S ohledem na tyto mechanismy byly v roce 1993 mutace CFTR genu rozděleny do 4 funkčních tříd (Welsh a Smith, 1993). Zmíněné funkční třídy používáme dodnes, kdy se v modifikované formě 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). Současný systém předkládá celkem 6 funkčních tříd. Někteří autoři z tohoto systému vyčleňují 7. funkční třídu, do které jsou řazeny rozsáhlé delece CFTR genu

s absencí tvorby CFTR mRNA (Welsh a Smith, 1993; De Boeck a Amaral, 2016; Veit et al., 2016) (Obr. 2.4).



Obr. 2.4 Funkční klasifikace mutací CFTR proteinu podle jednotlivých tříd. Podle funkčního defektu CFTR proteinu řadíme mutace CFTR do 7 funkčních tříd. Mutace I.–III. a VII. třídy charakterizuje absence nebo těžce narušená tvorba či funkce CFTR proteinu a jsou spojeny s jeho nulovou nebo minimální funkcí. Mutace IV.–VI. třídy jsou méně závažné, spojené s variabilní mírou reziduální funkce CFTR. Byly navrženy specifické terapie podle mechanismu vzniku funkčního defektu CFTR proteinu s předpokladem, že jedna léčivá molekula může být účinná na všechny mutace uvnitř stejné funkční třídy. **Upraveno dle De Boeck & Amaral (2016).**

Mutace I. třídy nevedou k tvorbě proteinu v jeho správné délce a/nebo se správnou aminokyselinovou sekvencí. Jedná se nejčastěji o nonsense mutace (tzv. stop kodon mutace), jejichž výsledkem je těžce strukturálně narušený nebo chybějící CFTR protein. **Mutace II. třídy** dávají vzniknout strukturálně abnormálnímu proteinu, který nevycestuje intracelulárně k buněčné membráně. Narušené je sbalení proteinu, který zůstává zadržen v endoplasmatickém retikulu a je následně degradován v lysozomu. Proces tvorby CFTR proteinu je pozastaven na úrovni vycestování (tzv. trafficking) proteinu k plazmatické membráně, čímž dochází k jeho významné redukci na membráně buňky. V případě **mutací III. třídy** protein vycestuje k povrchu buňky, jeho funkce je však narušena ve smyslu nedostatečného otevírání kanálu (tzv. gating mutace). **Mutace IV. třídy** vedou k nedostatečnému vedení iontů kanálkem, který je přítomen na buněčné membráně. **V. třída mutací** vede k nedostatečné tvorbě CFTR proteinu a tím i k jeho sníženému množství na povrchu buňky. Velmi často se jedná o mutace, které mají vliv na transkripční faktory lokalizované v promotorové oblasti genu nebo ještě častěji způsobí alternativní sestřih

(splicing) se vznikem aberantní i normální mRNA v jejich různém poměru. **Mutace VI. třídy** destabilizují CFTR protein po úpravě v endoplazmatickém retikulu a/nebo na povrchu buněčné membrány. Narušují jeho konformační stabilitu, zvyšují proces endocytózy nebo snižují recyklaci spojenou s návratem proteinu k buněčné membráně. To vše může vést ke zkrácení životnosti proteinu díky jeho strukturální nestabilitě. Mezi **mutace VII. třídy**, též klasifikované jako farmakologicky neopravitelné, řadíme velké delece znemožňující tvorbu i minimálního množství mRNA v buněčném jádru. Systém funkční klasifikace částečně selhává v případě mutací, které způsobují více než jeden funkční defekt. Příkladem je i nejčastější mutace CFTR genu F508del, která vedle poruchy vycestování (II. třída) vede i narušenému vedení vedení kanálkem (III. třída) a snížené stabilitě proteinu v plazmatické membráně (VI. třída) (Bell et al., 2015; Elborn, 2016). Mutace CFTR genu jsou spojeny s širokým spektrem klinických projevů onemocnění CF. Obecně lze konstatovat, že mutace I.–III. + VII.třídy v homozygotní nebo heterozygotní konstituci jsou spojeny s minimální nebo nulovou reziduální funkcí CFTR proteinu (Elborn, 2016). Tyto mutace vedou k časně manifestaci onemocnění s jeho závažnějším průběhem, jsou typicky spojené s pankreatickou insuficiencí a významnou progresí plicního onemocnění. Představují tzv. klasickou formu CF. V porovnání s tím jsou mutace IV.–VI. třídy spojeny s určitou reziduální funkcí CFTR proteinu, která je však velmi variabilní. Pacienti s tímto typem mutací alespoň na jedné alele mívají mírnější formu onemocnění, často spojenou s pankreatickou suficiencí (Cutting, 2015). Tuto formu nemoci označujeme také jako mírná/atypická/neklasická CF.

2.4. Standardní diagnostika CF a dostupné biomarkery funkce CFTR proteinu

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 potential difference), případně rektální sliznici (ICM, intestinal current measurement) (Sermet-Gaudelus et al., 2010; Derichs et al., 2010).

2.4.1. Potní test a NPD

Potní test a NPD jsou dlouhodobě nejvíce využívanými metodami k posouzení funkce CFTR proteinu v klinické praxi a v rámci ní pak především k diagnostickým účelům (Sermet-Gaudelus et al., 2010; Sermet-Gaudelus et al., 2011). Zvýšená hladina chloridů v potu se objevuje v časně fázi nemoci a může být měřena v jakémkoliv věku včetně novorozeneckého. Jedná se o neinvazivní a finančně nenáročnou metodu. Oproti tomu NPD představuje jedinou metodu in vivo, kterou lze přímo na epitelu nosní sliznice detekovat specifický CFTR dependentní transport chloridových iontů (nosní sliznice představuje snadno dostupné místo dýchacích cest). Obě metody, které využíváme jako biomarkery aktivity CFTR proteinu mohou mít i své nevýhody. Hodnocení NPD je časově i technicky náročné, určitá nespolehlivost se objevuje u pacientů se sekundárním poškozením nosní sliznice (polypy při pokročilém onemocnění CF). Hodnocení potního testu velmi závisí na technickém provedení a stavu kůže, z tohoto důvodu často vykazuje falešně pozitivní výsledky.

2.4.2. Molekulárně genetické vyšetření CFTR genu

Většina dostupných vyšetřovacích metod je cílena na již známé mutace CFTR genu, které mají přímou souvislost se vznikem onemocnění CF. Existuje však mnoho variant, které přímou souvislost se vznikem onemocnění nemají anebo jejich kauzalita s CF není objasněna. Mnoho variant s familiárním výskytem zůstává doposud neobjeveno a mnoho z nich se nachází v intronových oblastech nebo regulačních doménách CFTR genu. Zůstávají tak přes extenzivní metodiku neidentifikovány (Farrell et al., 2020). Určení diagnózy CF může být v těchto případech problematické a nejednoznačné.

2.4.3. Novorozenecký screening

Novorozenecký screening (NBS, newborn screening) je zásadní pro časnou diagnózu nemoci, časně zahájení léčby a tím i zlepšení celkové doby přežití pacientů s CF. K diagnostice CF je využíván imunoreaktivní trypsinogen (IRT), produkt slinivky břišní, jehož koncentrace bývá v krvi novorozeneckých dětí s CF o něco vyšší než u zdravé populace

jako důsledek poškození tkáně pankreatu (Castellani et al., 2016). V České republice byl celoplošný novorozenecký screening zaveden v roce 2009.

2.4.4. Fekální elastáza-1

Stanovení hodnoty fekální elastázy-1 (FEE-1) metodou ELISA slouží k detekci pankreatické insuficience u pacientů s CF. Standardní cut-off hodnoty (norma ≥ 200 $\mu\text{g/g}$) lze použít od 3. týdně věku pacienta, což vede nejen k časně diagnostice zevně sekretorické insuficience pankreatu, ale současně k zahájení suplementace trávicích enzymů v případě pozitivního výsledku (Cade et al., 2000). V klinické praxi je stanovení pankreatické insuficience zásadní s ohledem na prognózu onemocnění. Nulové nebo velmi nízké hodnoty fekální elastázy-1 jsou typicky spojeny s mutacemi I.–III. funkční třídy a s klasickým průběhem CF. Oproti tomu hraniční nebo normální hodnoty tohoto enzymu ve stolici bývají spojeny s přítomností alespoň jedné mutace IV.–VI. funkční třídy a mírnějším průběhem nemoci, i když s určitou mírou variability (Daftary et al., 2006).

2.5. Kauzální léčba CF

Symptomatická léčba, na rozdíl od léčby kauzální, neřeší molekulární defekt samotného onemocnění, na jehož úrovni by bylo možné principiálně zabránit sérii nepříznivých změn vedoucích k nevratnému poškození plicní tkáně. Od roku 1989, kdy byl identifikován CFTR gen (Kerem et al., 1989), je výzkum v oblasti CF zaměřen právě na vývoj nových terapií směřujících k opravě mutovaného genu, resp. k záchraně ztracené funkce CFTR proteinu. Kauzální léčba se v posledních letech stává součástí standardní péče u velké části pacientů s CF. 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. Včasné zahájení léčby modulátory CFTR proteinu může zmírnit nebo dokonce předejít vznik ireverzibilních změn, ještě před nástupem prvních symptomů onemocnění. 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). Přehled všech dostupných modulátorů CFTR proteinu schválených Evropskou lékovou agenturou (EMA) je uveden v Tab. 2.1.

Tab. 2.1 Modulátory CFTR proteinu schválené ke klinickému použití Evropskou lékovou agenturou (EMA, European Medicines Agency, 2021)

Modulátor CFTR proteinu			Mutace indikované k léčbě	Schváleno ke klinickému použití (rok)
	Korektor	Potenciátor		
Kalydeco®		Ivakaftor (VX – 770)	9 mutací III. třídy: G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N, S549R + R117H	2012
Orkambi®	Lumakaftor (VX – 809)	Ivakaftor (VX – 770)	F508del/F508del	2015
Symkevi®	Tezakaftor (VX – 661)	Ivakaftor (VX – 770)	F508del/F508del F508del/jedna z následujících mutací: P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711 + 3A>G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789 + 5G>A, 3272 - 26A>G, 3849+10kbC>T	2018
Kaftrio®	Elexakaftor + Tezakaftor (VX – 445/661)	Ivakaftor (VX – 770)	F508del/F508del F508del/mutace s minimální funkcí	2020

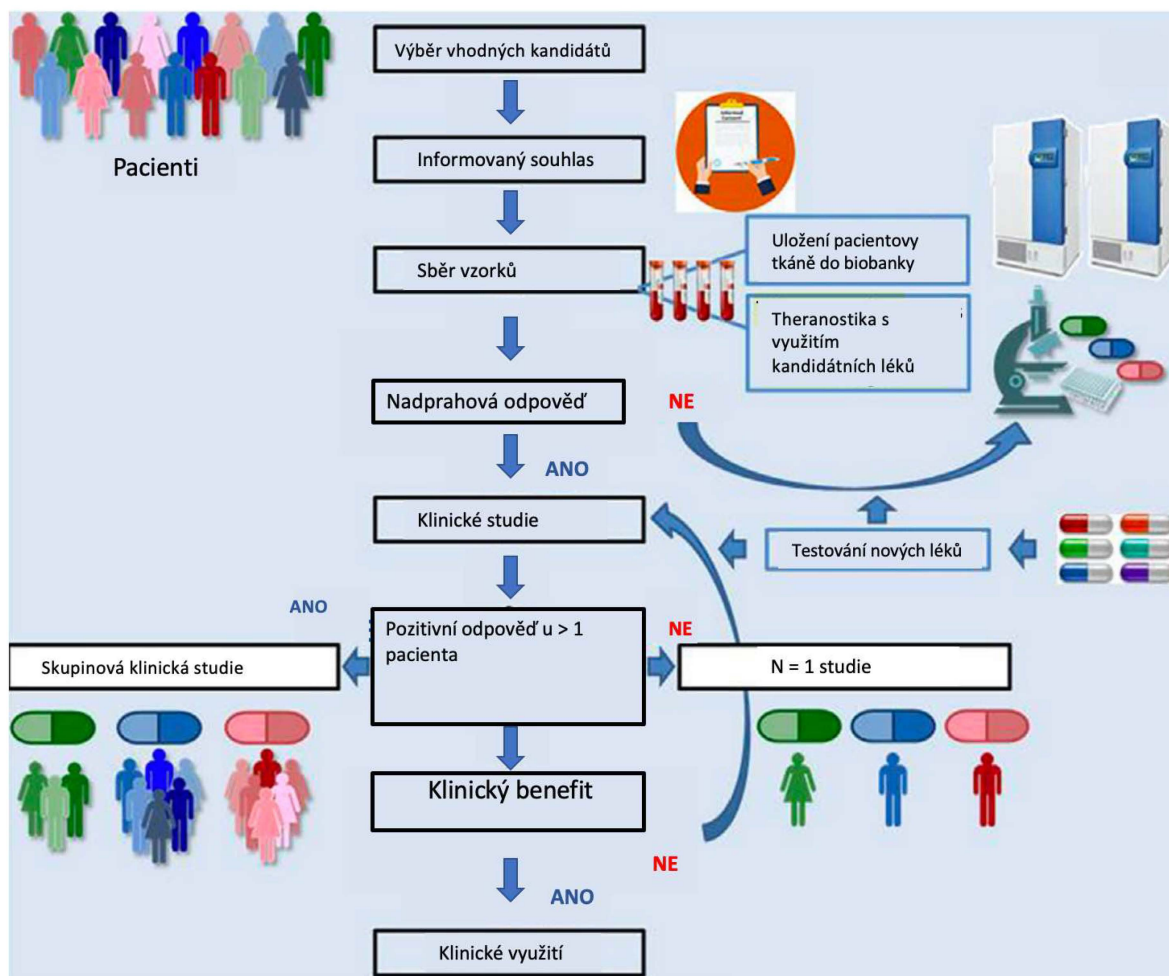
2.6. Orphan mutace

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 (viz výše kap. 2.4.) samotného onemocnění, ale současně i predikce možného léčebného potenciálu již dostupných modulátorů CFTR proteinu. Klasická klinická studie, která by stanovila případný účinek nového léku u těchto pacientů je kvůli jejich malému počtu neproveditelná. Omezené jsou také zdroje buněčných linií (HBEs, human bronchial epithelial cells), které jsou k hodnocení in vitro léčebného efektu nejčastěji využívány. Jedná se o epitelální buňky kultivované z explantovaných plic pacientů s CF, kteří podstoupili transplantaci plic. Jelikož se jedná nejčastěji o pacienty nesoucí mutaci F508del v homozygotní/heterozygotní konstituci, pacientů nesoucích velmi vzácné mutace je nedostatek. Jako alternativa k těmto klasickým klinickým studiím se v posledních letech objevují přístupy, které využívají buněčné modely odvozené z vlastní tkáně pacienta k predikci individuální *ex vivo* odpovědi na modulátory CFTR proteinu.

2.6.1. Theranostika, theratypy a jejich definice

Za účelem rozdělení variant CFTR genu podle jejich reaktivity 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 (viz kap. 2.3.).

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 (Obr. 2.5). Pomocí theranostiky by se k nejlepší možné kombinaci léčebných molekul dostali nakonec i pacienti nesoucí již klasifikované a častější mutace CFTR genu (např. F508del), protože i u nich je léčebná odpověď velmi pravděpodobně dána nejen onou mutací CFTR způsobující CF, ale interakcí dalších faktorů na genetickém pozadí pacienta (vlivem genů modifikujících CF). Podstatná je zde snaha exaktně definovat molekulární mechanismus, který zodpovídá za vznik defektního CFTR proteinu. Příkladem mohou být missense mutace (gating mutace) a nekanonické sestřihové varianty CFTR genu, u kterých lze dosáhnout pomocí ivakaftoru stejnou léčebnou odpověď, avšak odlišnou strategií. V prvním případě jde o nápravu otevírání kanálu, v případě druhém se jedná o nadměrnou aktivaci normálního CFTR proteinu přítomného ve sníženém množství na plazmatické membráně (Clancy et al., 2019). Hlavním cílem theranostiky je tedy co nejpřesnější *ex vivo* charakteristika reaktivity mutací CFTR genu na dostupné modulatory 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 (viz kap. 2.7.).



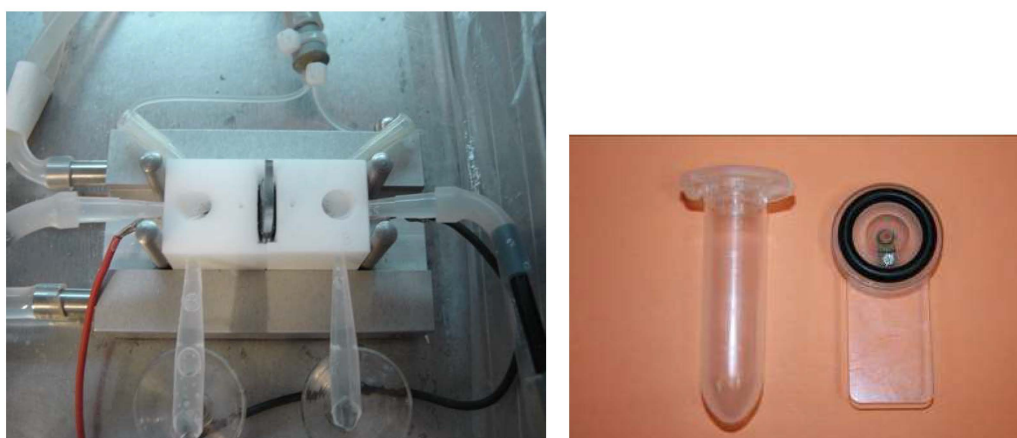
Obr. 2.5 Schéma znázorňující nově navržený přístup za účelem provádění klinických studií s nasazením příslušné léčby modulátory CFTR proteinu. Návrh se zaměřuje na možnosti využití pacientovy vlastní tkáně k predikci individuální odpovědi, tj. na theranostiku z pacientovy vlastní tkáně. Jednotlivé barvy odpovídají podskupinám pacientů, tzn. že osoby stejné barvy sdílejí podobnou odpověď na léčebné molekuly. **Upraveno dle Amaral et al., (2019).**

2.7. *Ex vivo* modely

2.7.1. 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, karchol, forskolin/3-isobutyl-methylxanthin (IBMX) a indomethacin

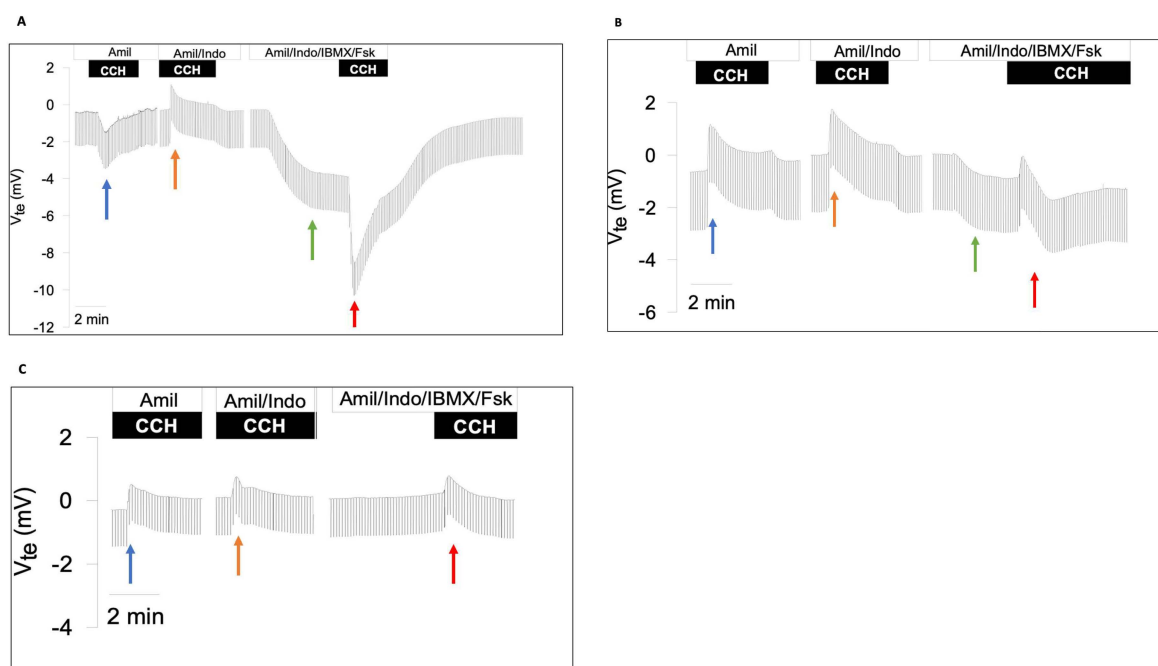
omývají apikální stranu buněčné membrány a působí očekávané změny jejího napětí v korelaci s mírou funkce CFTR proteinu. Samotnou funkci CFTR proteinu determinuje reakce na cAMP a kalcium dependentní aktivátory, tedy forskolin, IBMX a karbachol. Od jejího zavedení se stala důležitou experimentální metodou, která napomáhá obdobně jako NPD v případech diagnostiky mírných forem onemocnění nebo u pacientů s neznámými či velmi vzácnými mutacemi s nejasným klinickým významem. Její výhodou je v porovnání s NPD nenáročnost na spolupráci pacienta, kdy k samotné analýze postačí odebrání jednoho vzorku rektální biopsie. Vzorek tkáně je uchycen v kruhovém disku, který je následně umístěn v komůrce a kontinuálně omýván roztoky jasně definovaného složení (Obr. 2.6).



Obr. 2.6 Ussingova komůrka k analýze rektálních biopsií (vlevo) a zasunovací disk k upevnění tkáně v komůrce (vpravo). Zdroj: vlastní zpracování.

Přítomnost karbacholu (CCH) bazolaterálně indukuje ve tkáni zdravého jedince odpověď ve smyslu sekrece chloridových iontů lumenálně (na záznamu hodnotitelná jako tranzientní lumen negativní výchylka V_{te}) a naopak ve tkáni pacienta s CF vede v důsledku malé/žádné aktivity CFTR kanálku k sekreci draslíkových iontů lumenálně (na záznamu hodnotitelná jako tranzientní lumen pozitivní výchylka V_{te}) (Obr. 2.7 A–C, první vlna, modře). Vzhledem k nízké hladině endogenních prostaglandinů, které stimulují tvorbu cAMP prostřednictvím adenylátcyklázy, můžeme někdy pozorovat lumen pozitivní odpověď i u zdravých jedinců. CCH + Indometacin (Indo) by měly vést k sekreci draslíkových iontů lumenálně (povšechnou inhibicí CFTR proteinu vyvolají příslušnou odpověď ve všech tkáních). Tento krok tedy slouží jako pozitivní kontrola správného provedení experimentu (Obr. 2.7 A–C, druhá vlna, oranžově). 3-isobutyl-1-methylxantin/Forskolin (IBMX/Fsk) vedou standardně k sekreci chloridových iontů lumenálně, a tím i k lumen negativní odpovědi ve tkáních s funkčním CFTR proteinem (Obr. 2.7 A-B, třetí vlna, zeleně). CCH + IBMX/Fsk + Indo vedou ve tkáních zdravého jedince k další stimulaci sekrece chloridových iontů lumenálně,

a tím k prohloubení lumen negativní výchylky V_{te} (Obr. 2.7 A, čtvrtá vlna, červeně). Ve tkáních pacienta s klasickou formou CF stimulují sekreci draslíkových iontů lumenálně a vedou naopak k lumen pozitivní výchylce V_{te} (Obr. 2.7 C, čtvrtá vlna, červeně). Ve tkáních pacienta s reziduální funkcí CFTR proteinu vedou k bifázické (lumen pozitivní a následně lumen negativní) odpovědi (Obr. 2.7 B, čtvrtá vlna, červeně).



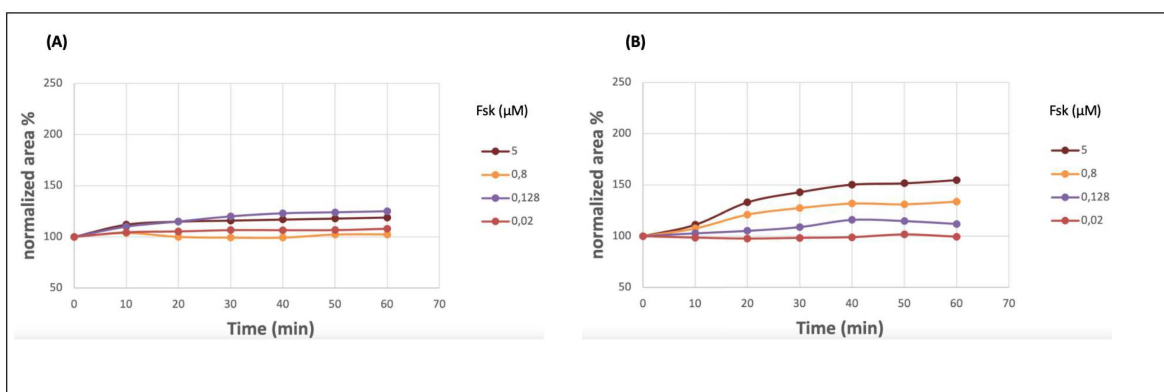
Obr. 2.7 Reprezentativní záznamy měření v Ussingově komůrce zobrazující 3 charakteristické vzorce odpovědi: (A) zdravá kontrola, (B) jedince s mírnou formou CF a (C) jedinec s klasickou formou CF. První vlna po stimulaci carbacholem značena jako modrá šipka, druhá vlna po stimulaci carbachol + indomethacin označena jako oranžová šipka, třetí vlna po stimulaci IBMX/Fsk označena jako zelená šipka a čtvrtá vlna po stimulaci carbachol + IBMX/Fsk + indomethacin označena jako červená šipka. Zdroj vlastní.

Výsledky měření funkce CFTR proteinu na rektálních biopsiích v kombinaci s koncentrací chloridů v potu a hodnotou FEE-1 představují nejcitlivější nástroj k odlišení pacientů s klasickou nebo mírnou formou CF od zdravé populace (Sousa et al., 2012).

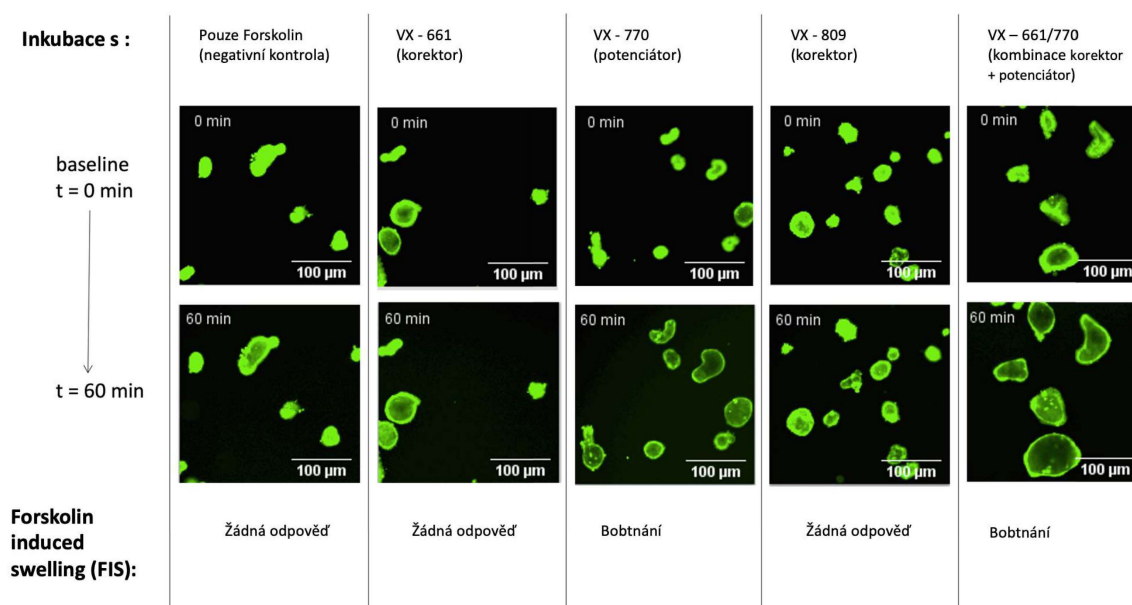
2.7.2. Intestinální organoidy a forskolinem indukované bobtnání organoidu

Krypty střevní sliznice člověka obsahují primitivní nediferencované buňky, které je současnými technikami možno izolovat a za standardizovaných podmínek vytvořit sérii kultivací 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) (Obr. 2.8 a Obr. 2.9).

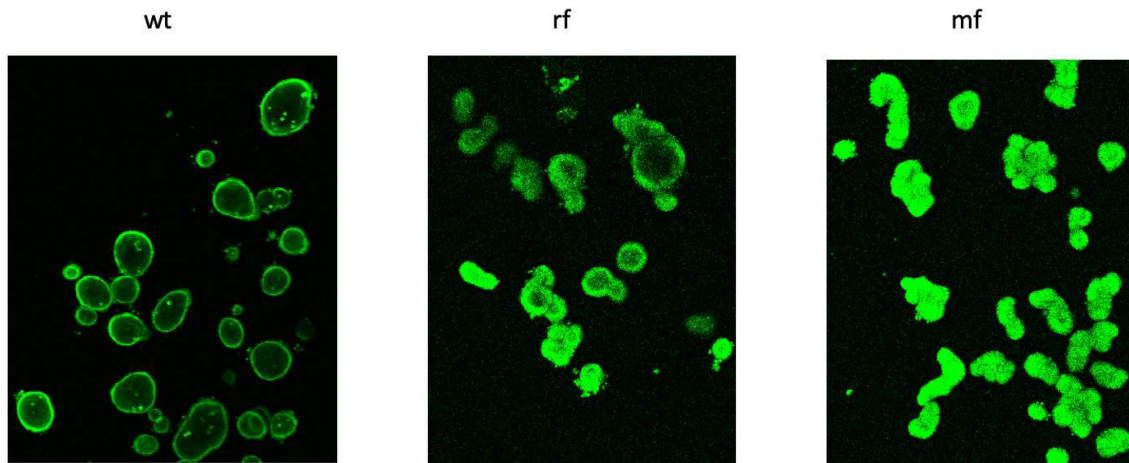


Obr. 2.8 Kvantifikace vzestupu plochy (bobtnání) organoidu. Reprezentativní záznamy bobtnání organoidu vztažené k $t = 0$ min (normalizovaná plocha, normalized area) při odlišných koncentracích forskolinu v případě kdy (A) přidání léčebných molekul nemá žádný efekt na bobtnání organoidu a (B) přidání léčebných molekul vede k bobtnání organoidu. Fsk – forskolin.



Obr. 2.9 Reprezentativní záznam provedené FIS assay. V konfokálním mikroskopu se po nabarvení kalceinovou zelení zobrazují organoidy, které po přidání pouze forskolinu (negativní kontrola) nebo forskolinu a příslušného korektoru/potenciátoru bobtnají v závislosti na míře funkce CFTR proteinu.

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. Hodnoceným parametrem je i fenotyp organoidů za bazálních podmínek bez přidání léčebných molekul, odlišný v případě organoidů zdravé kontroly, pacienta s minimální nebo přítomnou reziduální funkcí CFTR proteinu (Obr. 2.10) (Dekkers et al., 2016).



Obr. 2.10 Fenotyp organoidů za bazálních podmínek bez přidání léčebných molekul. wt – wild type (zdravá kontrola), mf – minimální funkce, rf – reziduální funkce

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.

3. CÍL 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 kultur 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; Van Ommen 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* reaktibility 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 reaktibilitu 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 sourozenecké 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.

Translace tohoto výzkumu do klinické praxe se stává ve shodě s principem theranostiky základem pro personalizovanou péči o všechny pacienty s CF.

4. 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

5. MATERIÁL A METODY

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 Kunzelmanna). Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole. Informovaný souhlas byl podepsán pacientem nebo oběma zákonnými zástupci v případě nezletilého pacienta.

5.1. Analýza funkce CFTR proteinu

5.1.1. Rektální biopsie

5.1.1.1. Měření v Ussingově komůrce

Po přípravě koncové části tlustého střeva klyzmatem (100–150ml fyziologického roztoku) bylo klíčkovou metodou za endoskopické kontroly odebráno 6–8 povrchových vzorků rektální biopsie, které byly okamžitě po odběru uchovány v chladném mediu a následně analyzovány za podmínek otevřeného elektrického okruhu v kontinuálně promývané Ussingově komůrce (Mall et al., 2004; Sousa et al., 2012). K počáteční ekvilibraci tkáně byl luminální a bazolaterální povrch střevního epitelu 30 minut omýván Ringerovým roztokem s následujícím složením (mmol/l): NaCl 145, KH_2PO_4 0.4, KH_2PO_4 1.6, D-glukóza 5, MgCl_2 1, Ca-glukonát 1.3, pH 7,40 (NaOH, HCl), 280 mosm/kg, 37 °C. Po ukončení ekvibrace byla tkáň omývána specifickými experimentálními roztoky (viz kap. 2.7.1.). 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 ($\Delta I = 0,5 \mu\text{A}$) 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 náležité 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 ($\Delta I_{sc-IBMX/Fsk} + \Delta I_{sc-CCH(IBMX/Fsk)}$) 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).

5.1.1.2. Intestinální organoidy a FIS assay

Izolace krypt z rektálních biopsií získaných od pacientů s CF a kultury intestinálních organoidů byly vytvořeny dle dříve popsanych postupů laboratoře v Utrechtu (Holandsko) (Dekkers et al., 2013). Rektální biopsie byly za nepřetržitého třepání uloženy při teplotě $4^\circ C$ po dobu 90 minut v PBS (Invitrogen, USA) s 10 mM EDTA (Invitrogen, USA). Uvolněné krypty obsahující kmenové buňky byly následně prudkým promýváním pipetou v PBS rozrušeny za současného oddělení supernatantu. Supernatant byl centrifugován (230 g, 5 minut, $4^\circ C$), usazené krypty resuspendovány v 50% Matrigelu (Corning, USA) naředěném kompletním kultivačním médiem 20% F12ghp, 2% B27 (Invitrogen, USA), 1,25 mM N-acetylcystein (Sigma-Aldrich, USA), 50 ng/mL myší epidermální růstový factor (Invitrogen, USA), 50% Wnt-3a-conditioned medium (připraveno v laboratoři), 10% Noggin-conditioned medium (připraveno v laboratoři), 20% R-spondin-conditioned medium (připraveno v laboratoři), 10 mM nicotinamide (Sigma-Aldrich, USA), 500 nM TGF-beta inhibitor A83-01 (Tocris Bioscience, Germany), 10 μM P38 MAPK inhibitor SB 202190 (Sigma-Aldrich, USA); a 0.2% Primocin (antibiotikum, InvivoGen, USA). Krypty byly v matrigelu usazeny v jamkách laboratorních destiček (přibližně 10–30 krypt na 10 μl). Matrigel byl polymerizován v inkubátoru po dobu 20 minut při teplotě $37^\circ C$. Do kultur byl přidán během prvního týdne gentamicin (Sigma-Aldrich, USA), jelikož jsou počáteční pasáže více náchylné k bakteriální kontaminaci. Kultivační medium bylo měněno každé 2–3 dny. Po 7–10 dnech dochází přes uzavírání krypt a tvorbu pupenců k tvorbě intestinálních organoidů, které jsou následně mechanicky rozděleny a dále pasážovány. Po izolaci krypt ze střevních biopsií byly založeny kultury střevních organoidů, na kterých byla dále provedena FIS assay (Berkers et al., 2019), 3–4 experimenty od každého pacienta. Organoidy byly usazeny v matrigelu v predehřáté 96jamkové destičce a inkubovány během

24 hodin s CFTR korektory, VX-809 (3 μM , Selleckchem, USA) nebo VX-661 (5 μM , Selleckchem, USA). Po nabarvení kalceinovou zelení bezprostředně před samotným experimentem (3 μM) (Invitrogen, USA), byly přidány roztoky 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM forskolinu (Fsk, Sigma-Aldrich, USA) nebo kombinace vzestupné koncentrace forskolinu a CFTR potenciátoru VX-770 (3 μM , Selleckchem, USA). Experiment byl proveden na konfokálním mikroskopu (Leica DMI 6000B, Leica Microsystems, Germany) s inkubační komůrkou udržující stálou teplotu 37 °C s příměsí 5% CO₂. 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 vztahovaná k ploše organoidu v čase nula (normalized organoid area, normalizovaná plocha organoidu, Obr. 5.2) 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 μM jako referenční pro hodnocení možného klinického benefitu in vivo. Hodnoty AUC 750 a 1500 jako práh pro potenciální střední a vysoký klinický benefit (Dekkers et al., 2016).

5.2. 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 $p < 0.05$.

6. VÝSLEDKY

6.1. Pacienti, analyzované vzorky

V rámci našeho projektu jsme analyzovali vzorky odebrané od celkem 14 pacientů. Přehled klinických dat a vzorků, které jsme analyzovali je uveden v Tab. 6.1.

Tab. 6.1 Přehled klinických dat pacientů: kód pacienta, CFTR genotyp, pohlaví (M = male/F = female), věk v době projektu (roky), fekální elastáza-1 (FEE-1, ug/g stolice), pankreatická funkce (PS = pankreatická suficience/PI = pankreatická insuficience), objem vzduchu během usilovného výdechu za 1s (FEV₁, forced expiratory volume in 1s) v procentech náležitých hodnot, hladina chloridů v potu (Cl v potu, mmol/l), analyzované vzorky (RB - rektální biopsie, intestinální organoidy) a příbuzenský vztah s jinými pacienty v analyzované skupině. Barevné rozlišení: cíl č. 1, cíl č. 2, cíl č. 3

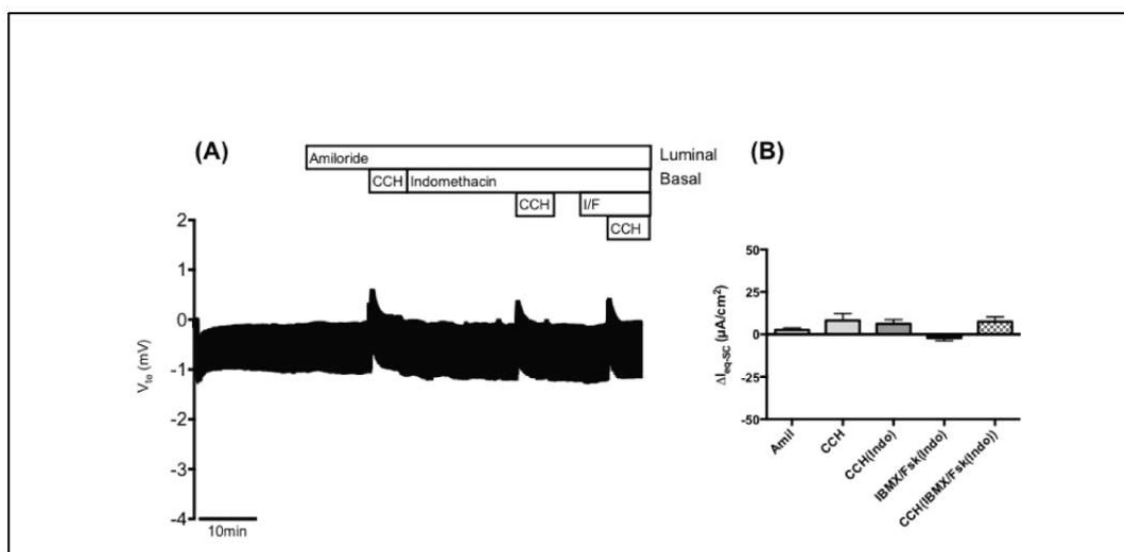
Pacient	CFTR genotyp	Pohlaví M/F	Věk (roky)	FEE-1 (μg/g)	PS/PI	FEV ₁ (%)	Cl v potu (mmol/)	Analýza	Příbuzný s CF
CF1	F508del/ F508del	M	16	4,0	PI	95	112,5	RB Organoidy	Ano CF2
CF2	F508del/ F508del	M	16	4,0	PI	95	112,5	RB Organoidy	Ano CF1
CF3	D1152H/ F508del	F	40	1020	PS	61	51,0	RB organoidy	Ne
CF4	D1152H/ N1303K	M	7	497,3	PS	124	20,0	RB Organoidy	Ano CF5
CF5	D1152H/ N1303K	M	8	1036,7	PS	111	33,0	RB Organoidy	Ano CF4
CF6	3849+10kbC>T/ F508del	F	30	573,0	PS	72	43,5	RB Organoidy	Ano CF7
CF7	3849+10kbC>T/ F508del	F	28	2400	PS	47	36,0	RB Organoidy	Ano CF6
CF8	3849+10kbC>T/ dele2,3	F	10	479	PS	75	60,0	Organoidy	Ne
CF9	3849+10kbC>T/ 621+1G>T	M	13	1200	PS	41	81,5	RB	Ne
CF10	2789+5G>A/ F508del	F	36	371,0	PS	52	91,0	RB Organoidy	Ano CF11
CF11	2789+5G>A/ F508del	M	37	516	PS	80	78,0	RB organoidy	Ano CF10

CF12	2789+5G>A/ Dele2,3	F	10	4380,0	PS	93	100,5	RB	Ne
								Organoidy	
CF13	F508del/ S955P	M	7	500,0	PS	95	56,5	RB	Ne
								Organoidy	
CF14	1717-2A>G/ F508del	M	3	14,0	PI	107	78,0	RB	Ne
								Organoidy	

6.2. Pacienti s klasickou formou CF

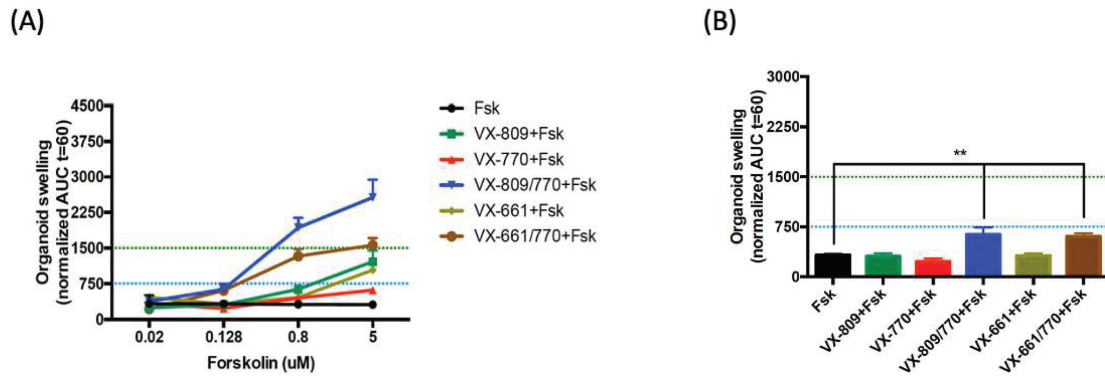
6.2.1. F508del/F508del

První dva pacienti (CF1 a CF2) analyzovaní v rámci našeho projektu byli sourozenci nesoucí mutaci F508del v homozygotní konstituci. Reprezentativní záznam měření na rektální biopsii pacienta CF1 (Obr. 6.1) potvrzuje, že se jedná o pacienta s klasickým genotypem CF (0 % funkce wt-CFTR).



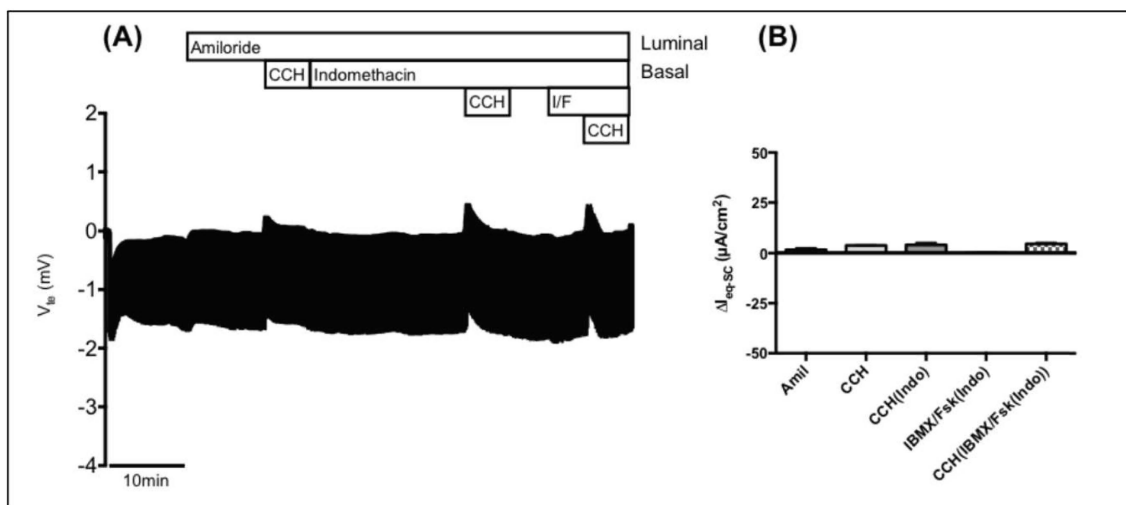
Obr. 6.1 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF1 (F508del/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μM/2 μM, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil (ΔI_{eq-sc}Amil), CCH (ΔI_{eq-sc} CCH), CCH + Indo (ΔI_{eq-sc,CCH}(Indo)), IBMX/Fsk + Indo (ΔI_{eq-sc,IBMX/Fsk}(Indo)) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo (ΔI_{eq-sc,CCH}(IBMX/Fsk(Indo))); data reprezentují průměr ze tří měření ± SEM. ΔI_{eq-sc,IBMX/Fsk}(Indo) = 2.124 ± 1.553 μA/cm², ΔI_{eq-sc,CCH}(Indo) = 7.436 ± 2.862 μA/cm². (0 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF1 (Obr. 6.2) prokázala při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM 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.



Obr. 6.2 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF1 (F508del/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

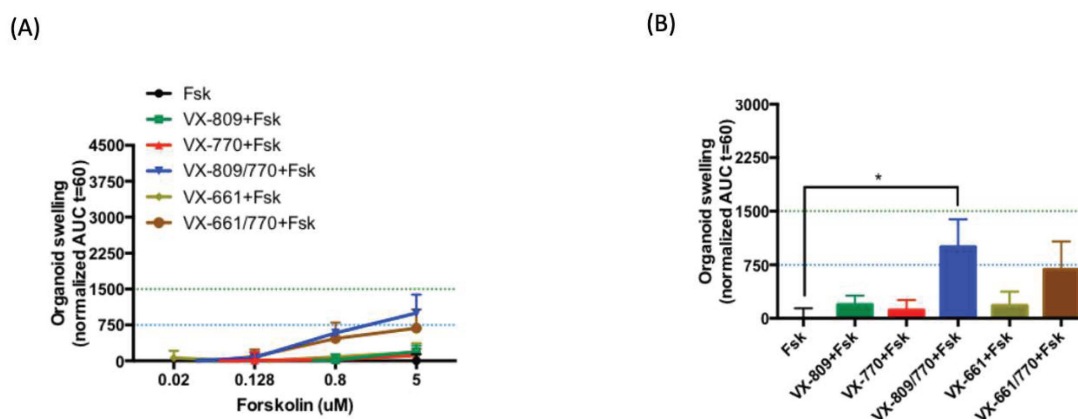
Měření v Ussing chamber v případě pacienta CF2 ukazují na profil pacienta s klasickým genotypem CF (0 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.3).



Obr. 6.3 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF2 (F508del/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 $\mu\text{M}/2$ μM , bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního

napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-scAmil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = 0.242 \pm 0.475 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = 4.629 \pm 0.671 \mu A/cm^2$. (0 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF2 prokázala nulové bobtnání organoidů při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM , bez ohledu na přidané léčebné molekuly. Signifikantní bobtnání jsme zaznamenali až při koncentraci forskolinu 5 μM (Obr. 6.4).

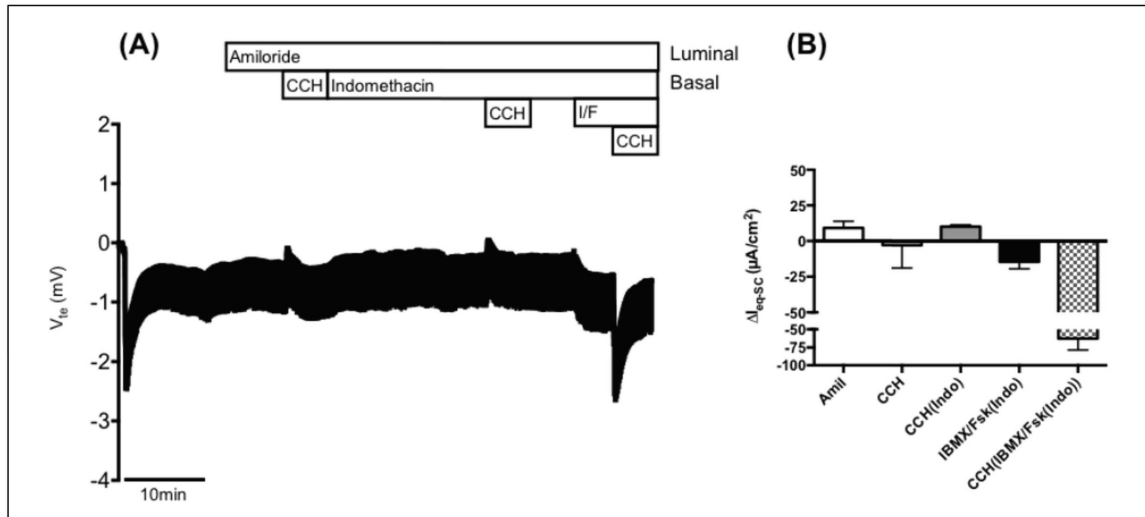


Obr. 6.4 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF2 (F508del/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 5 μM . Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. .* - hodnota $p < 0.05$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

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

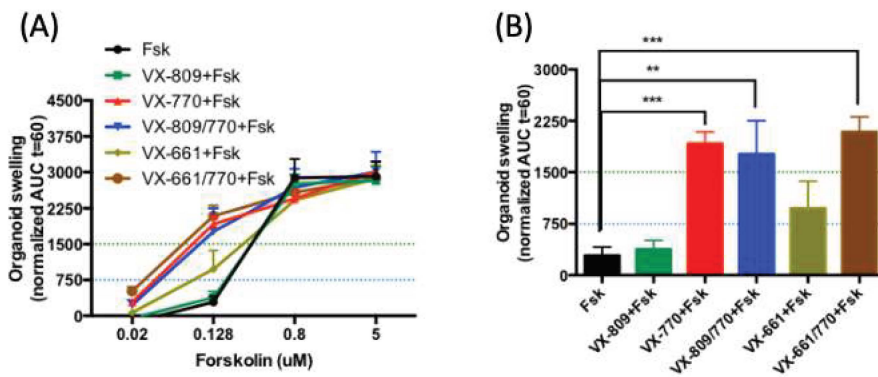
6.3.1. D1152H/F508del nebo jiná

Dalším pacientem, jehož vzorky byly analyzovány, je pacient CF3 nesoucí mutaci D1152H v heterozygotní konstituci s mutací F508del. Měření na rektálních biopsiích prokázalo u pacienta CF3 vysokou reziduální funkci CFTR proteinu (35,5 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.5).



Obr. 6.5 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF3 (D1152H/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μ M, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μ M/2 μ M, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-scAmil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -14.380 \pm 5.014 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = -62.860 \pm 15.540 \mu A/cm^2$. (35,5 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

FIS assay pacienta CF3 (Obr. 6.6) prokázala při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μ M 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.

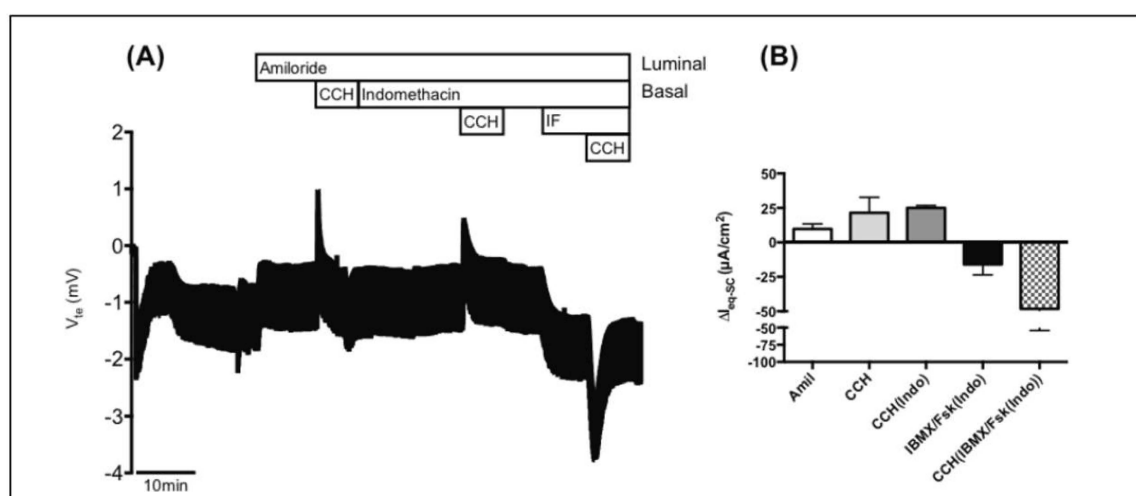


Obr. 6.6 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF3 (D1152H/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μ M, vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μ M. Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí

nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

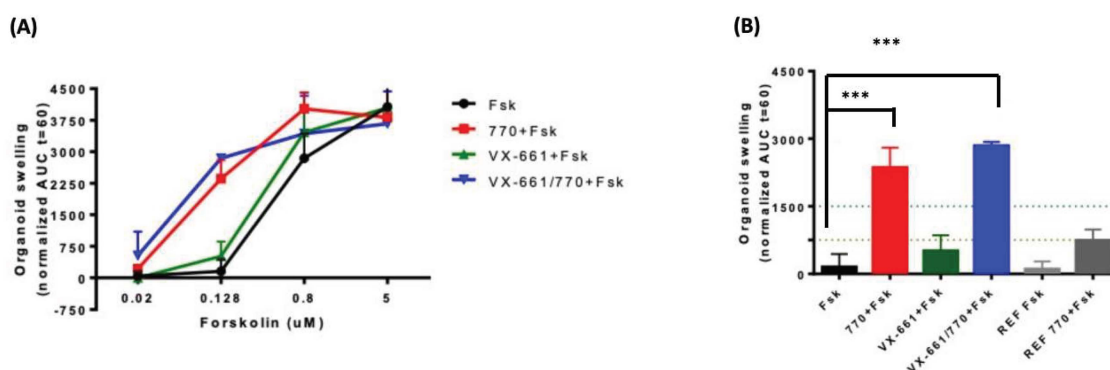
Dalšími pacienty, jejichž vzorky byly v rámci našeho projektu analyzovány, byli sourozenci (CF4 a CF5) nesoucí mutaci D1152H v heterozygotní konstituci s mutací N1303K.

Analýza rektálních biopsií pacienta CF4 (Obr. 6.7) prokázala vysokou míru reziduální funkce CFTR proteinu (29,5 % funkce wt-CFTR).



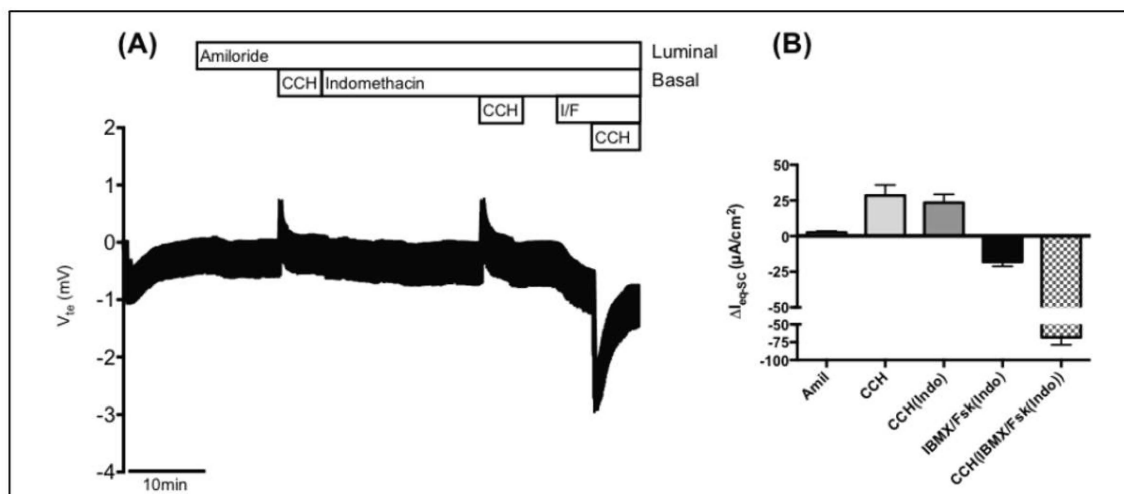
Obr. 6.7 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF4 (D1152H/N1303K). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μM /2 μM , bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMXXFsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -16.000 \pm 7.571 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMXXFsk(Indo))} = -48.220 \pm 6.139 \mu A/cm^2$. (29,5 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF4 prokázala při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM signifikantní bobtnání organoidů po přidání VX-770 nebo kombinace VX-661/770 (kombinaci VX-809/770 jsme v tomto případě netestovali) (Obr. 6.8). Míra bobtnání se pohybovala nad prahem pro potenciální vysoký klinický benefit pro pacienta.



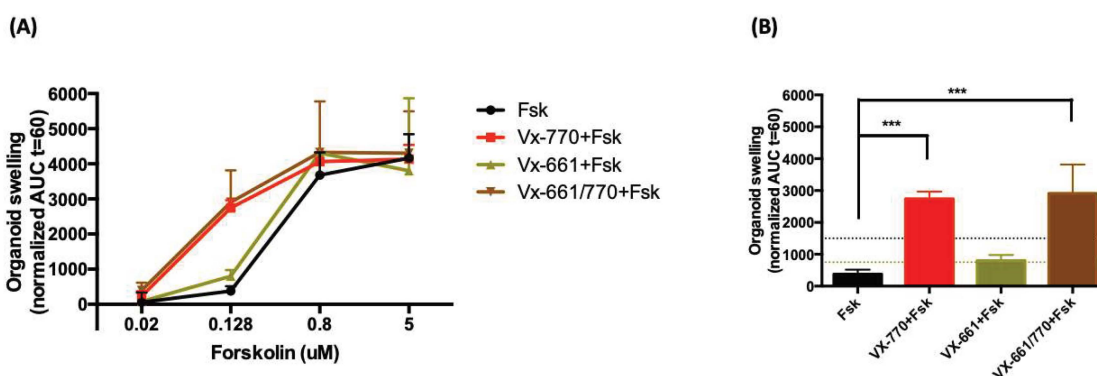
Obr. 6.8 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF4 (D1152H/N1303K). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná světlá a tmavě zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

Analýza rektálních biopsií pacienta CF5 (Obr. 6.9) prokázala vysokou míru reziduální funkce CFTR proteinu (39,7 % funkce wt-CFTR).



Obr. 6.9 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF5 (D1152H/N1303K). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 $\mu\text{M}/2 \mu\text{M}$, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -18.060 \pm 3.075 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))} = -68.180 \pm 10.430 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. (39,7 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF5 prokázala při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM signifikantní bobtnání organoidů po přidání VX-770 nebo kombinace VX-661/770 (kombinaci VX-809/770 jsme v tomto případě netestovali) (Obr. 6.10). Míra bobtnání se pohybovala nad prahem pro potenciální vysoký klinický benefit pro pacienta.

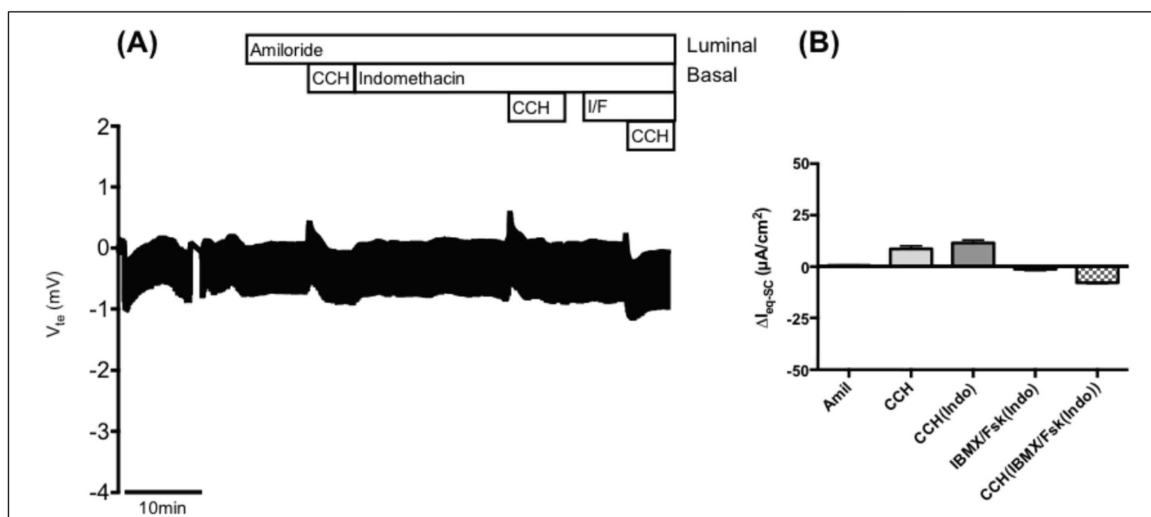


Obr. 6.10 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF5 (D1152H/N1303K). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná zelená a černá čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

6.3.2. 3849 + 10kbC>T/F508del nebo jiná

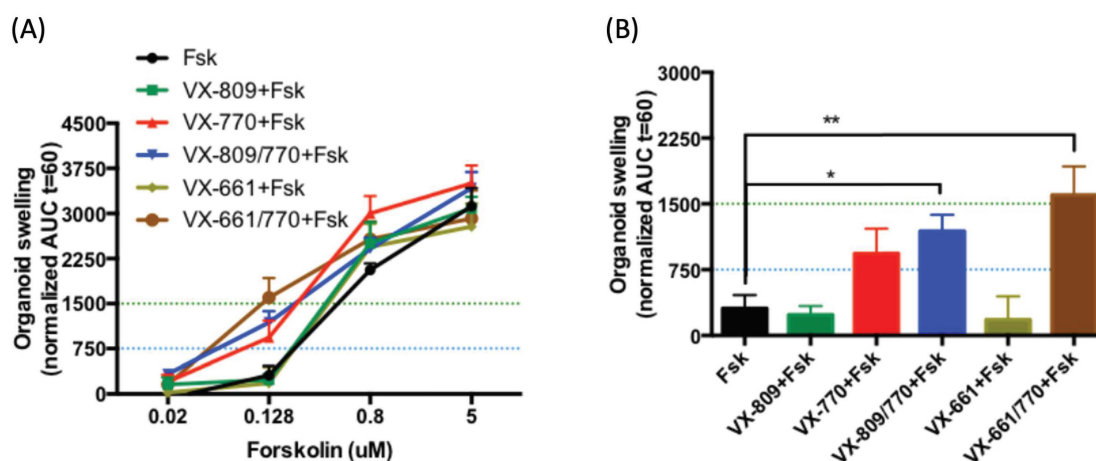
Dalšími pacienty, jejichž vzorky jsme analyzovali, jsou sourozenci (CF6 a CF7) nesoucí mutaci F508del v heterozygotní konstituci s mutací 3849+10kbC>T.

Analýza rektálních biopsií pacienta CF6 prokázala přítomnost reziduální funkce CFTR proteinu (v tomto případě 4,2 % funkce wt-CFTR, což je současně hodnota podporující diagnózu CF) (Obr. 6.11).



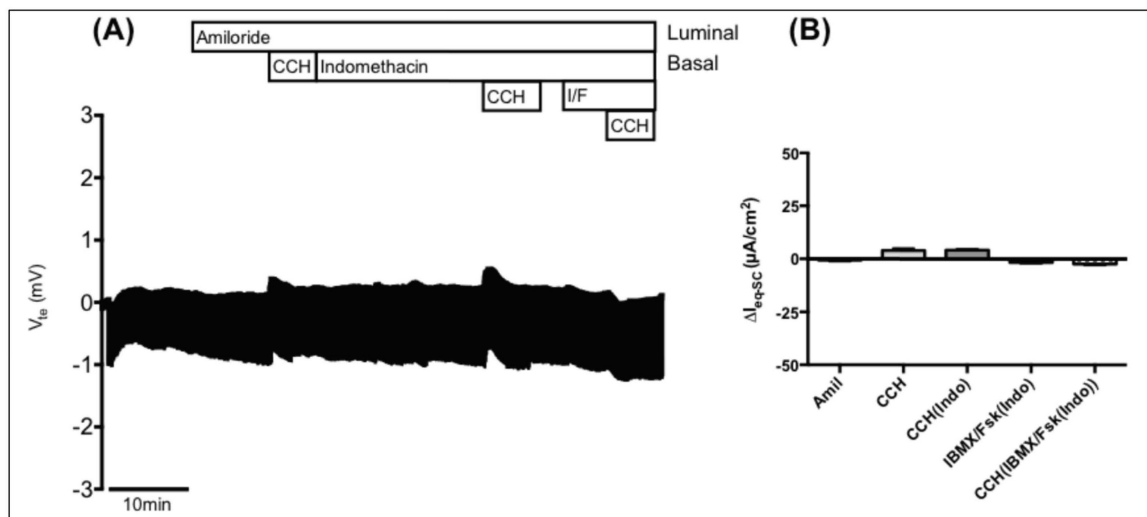
Obr. 6.11 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF6 (3849+10kbC>T/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 $\mu M/2 \mu M$, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudů v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -1.236 \pm 0.638 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))} = -7.796 \pm 0.370 \mu A/cm^2$. (4,2 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF6 (Obr. 6.12) prokázala při koncentraci forskolinu 0,128 μM 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.



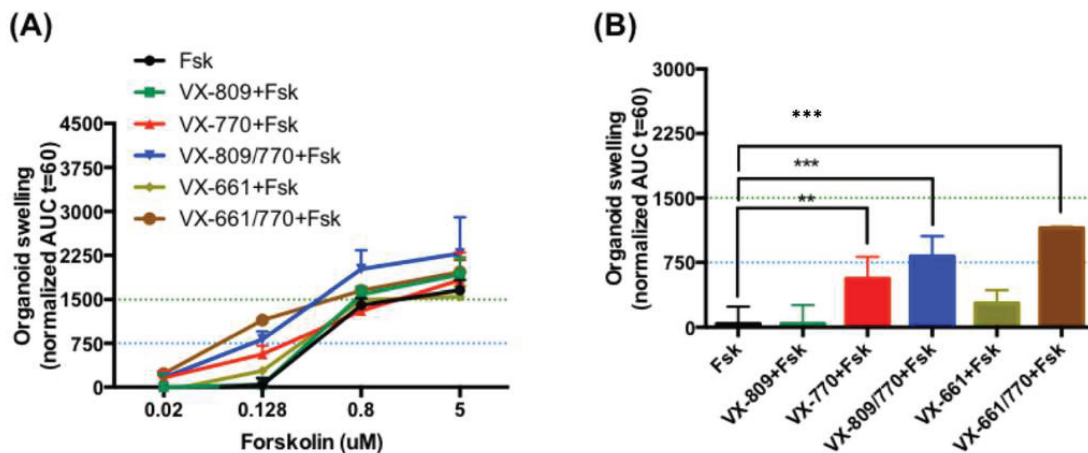
Obr. 6.12 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF6 (3849+10kbC>T/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

Podobný profil byl pozorován u pacienta CF7 (Obr. 6.13), u kterého byla průměrná maximální aktivace CFTR proteinu v porovnání se zdravou kontrolou 1,8 %, opět podporující diagnózu CF.



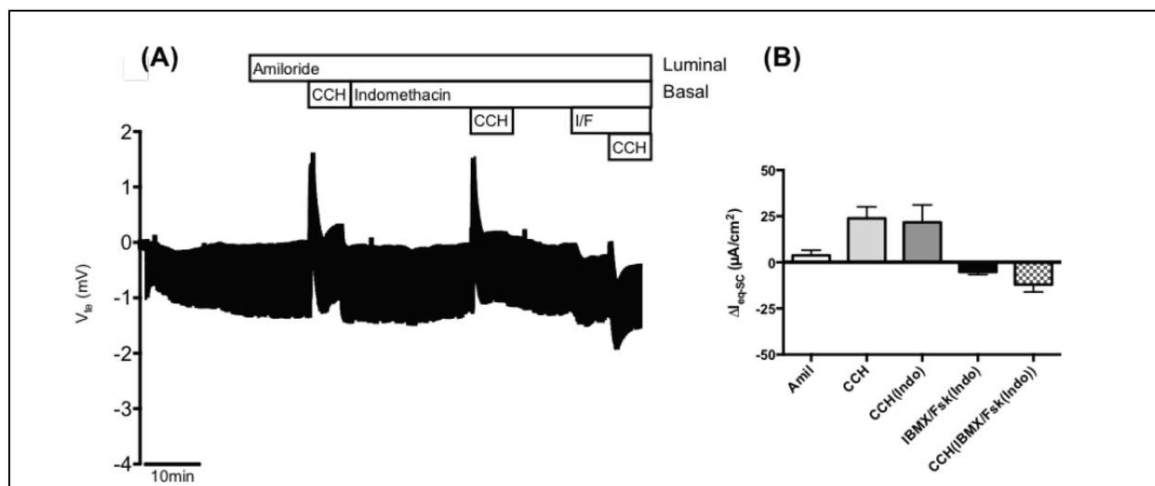
Obr. 6.13 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF7 (3849+10kbC>T/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F, 100 μM /2 μM , bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -1.604 \pm 0.503 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = -2.380 \pm 0.5816 \mu A/cm^2$. (1,8 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF7 (Obr. 6.14) prokázala při koncentraci forskolinu 0,128 μM signifikantní bobtnání organoidů po přidání samotného potenciátoru VX-770 i kombinací VX-809/770 a VX-661/770. V případě VX-770 bobtnání nedosahuje prahu pro potenciální střední klinický benefit, v případě obou kombinací dosahuje práh pro potenciální střední klinický benefit.



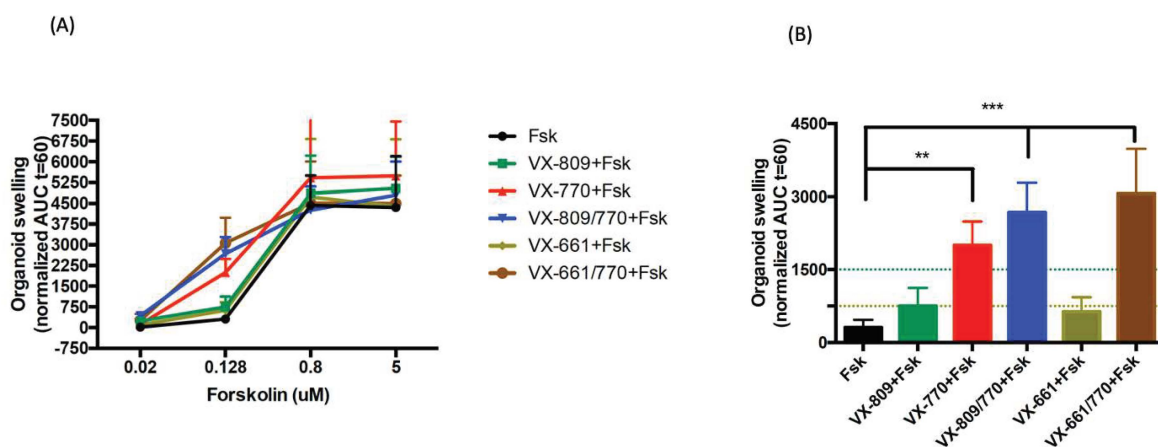
Obr. 6.14 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF7 (3849+10kbC>T/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM, vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM. Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

Další dva pacienti, jejichž tkáň byly analyzovány, jsou pacienti nesoucí mutaci 3849+10kbC>T v heterozygotní konstituci s jinou mutací než F508del. Jedná se o pacienta CF8 (genotyp 3849+10kbC>T/dele2,3(21kb)) a CF9 (genotyp 3849+10kbC>T/621+1G>T). Analýza rektálních biopsií pacienta CF8 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (7,9 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.15).



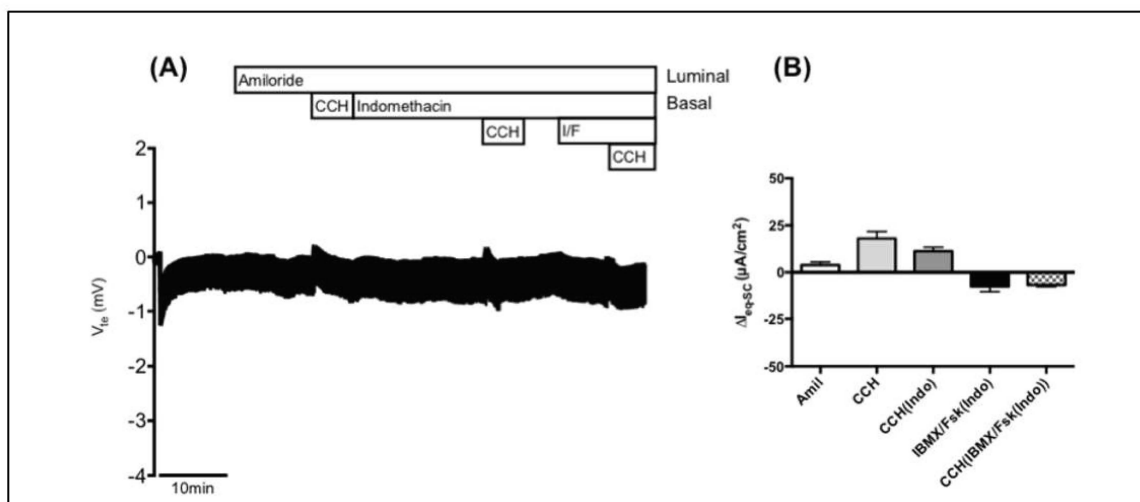
Obr. 6.15 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF8 (3849+10kbC>T/dele2,3(21kb)). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μ M, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, 1/F), 100 μ M/2 μ M, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -5.167 \pm 1.476 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = -12.020 \pm 3.996 \mu A/cm^2$. (7,9 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF8 (Obr. 6.16) prokázala při koncentraci forskolinu 0,128 μ M signifikantní záchranu funkce CFTR proteinu nejen přidáním samotného potenciátoru VX-770, ale ve větší míře přidáním obou kombinací léčebných molekul (tj. VX-809/770 nebo VX-661/770). Míra bobtnání organoidů dosahuje ve všech případech prahu pro potenciální vysoký klinický benefit.



Obr. 6.16 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF8 (3849+10kbC>T/dele2,3(21kb)). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidání léčebných molekul při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μ M, vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidání léčebných molekul při koncentraci Fsk 0,128 μ M. Tečkovaná světlá a tmavě zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

Analýza rektálních biopsií pacienta CF9 (Obr. 6.17) na rozdíl od pacienta CF8 nevykazuje zcela jasně charakteristický bifázický profil (je pouze naznačen, což může být v důsledku horší kvality analyzované tkáně). Průměrná maximální aktivace CFTR proteinu v porovnání se zdravou kontrolou činí 6,6 % funkce wt-CFTR.



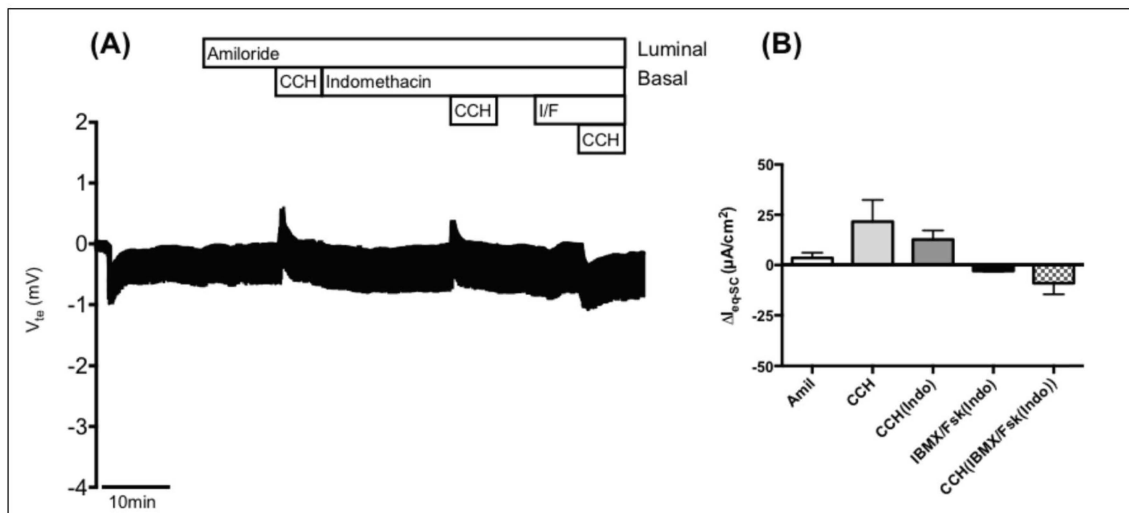
Obr. 6.17 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF9 (3849+10kbC>T/621+1G>T). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μ M, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F, 100 μ M/2 μ M, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IMBX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -7.568 \pm 2.804 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IMBX/Fsk(Indo))} = -6.774 \pm 0.947 \mu A/cm^2$. (6,6 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF9 se bohužel nepodařilo provést, technicky se nezdařila izolace krypt a následná kultivace intestinálních organoidů.

6.3.3. 2789+5G>A/F508del nebo jiná

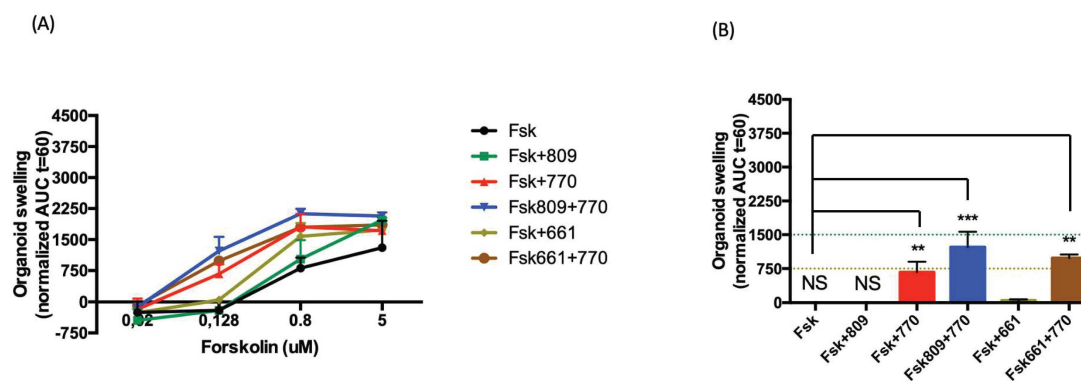
Dalšími pacienty, jejichž vzorky byly v našem projektu analyzovány, jsou sourozenci (CF10 a CF11) nesoucí mutaci 2789+5G>A v heterozygotní konstituci s mutací F508del.

Analýza rektálních biopsií pacientů CF10 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (5,5 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.18).



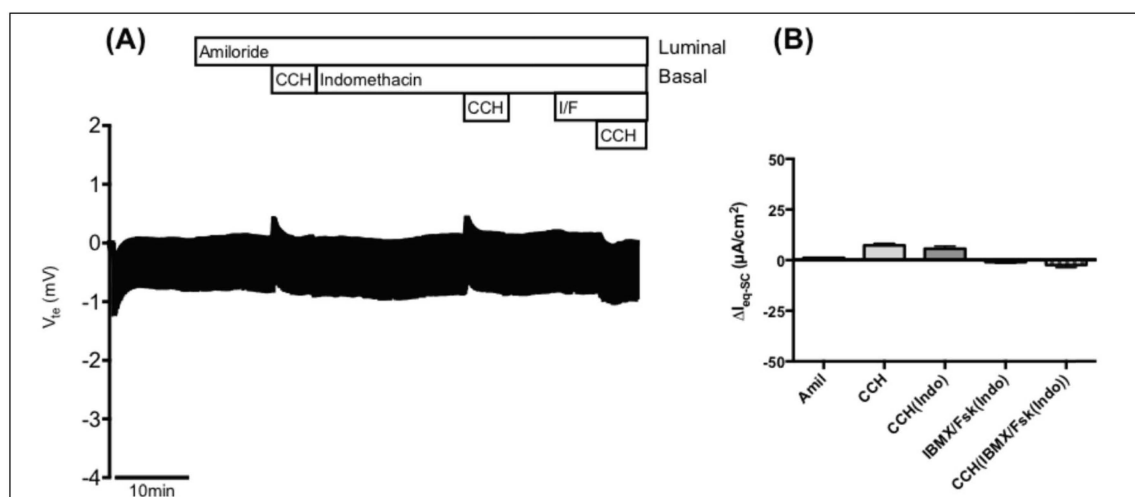
Obr. 6.18 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF10 (2789+5G>A/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μ M, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μ M/2 μ M, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMx/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -2.961 \pm 0.280 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMx/Fsk(Indo))} = -9.054 \pm 5.474 \mu A/cm^2$. (5.5 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay v případě pacienta CF10 při koncentraci forskolinu 0,128 μ M prokázala signifikantní odpověď, a to po přidání jak samotného potenciátoru (VX-770), tak kombinace léčebných molekul. Prahu pro potenciální střední klinický benefit dosahuje odpověď po přidání kombinace VX-661/770 nebo ještě významněji VX-809/770 (Obr. 6.19).



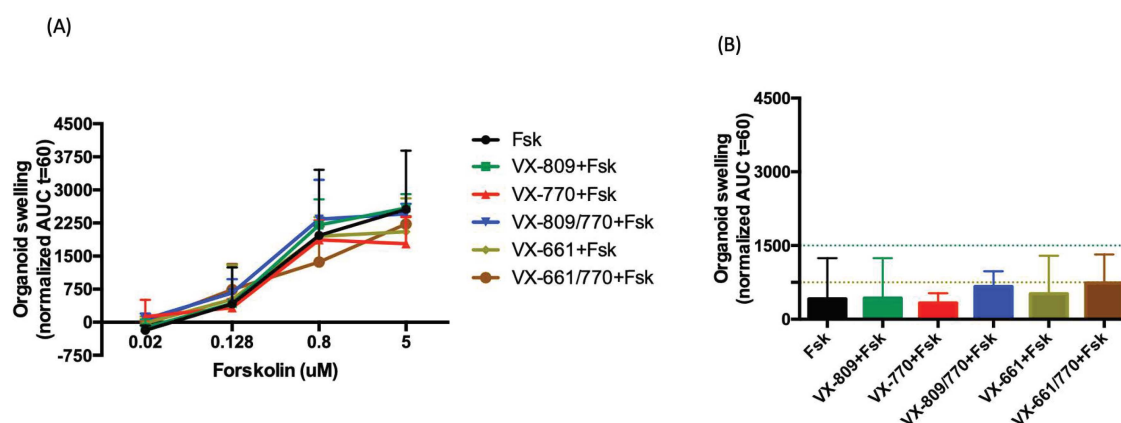
Obr. 6.19 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF10 (2789+5G>A/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μ M, vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μ M. Tečkovaná světlá a tmavě zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

Analýza rektálních biopsií pacientů CF11 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (1,5 % funkce wt-CFTR). (Obr. 6.20)



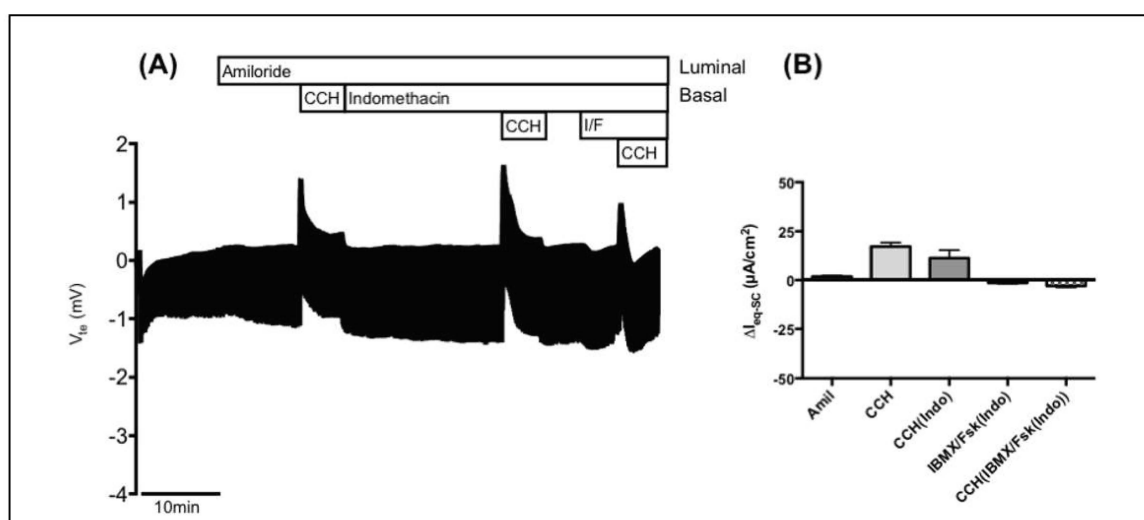
Obr. 6.20 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF11 (2789+5G>A/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μ M, bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μ M/2 μ M, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudů v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc} pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -0.982 \pm 0.495 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))} = -2.383 \pm 1.237 \mu A/cm^2$. (1,5 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

FIS assay neprokázala v případě pacienta CF11 při koncentraci forskolinu 0,128 μ M signifikantní bobtnání po přidání samotného potenciátoru či kombinace léčebných molekul (Obr. 6.21).



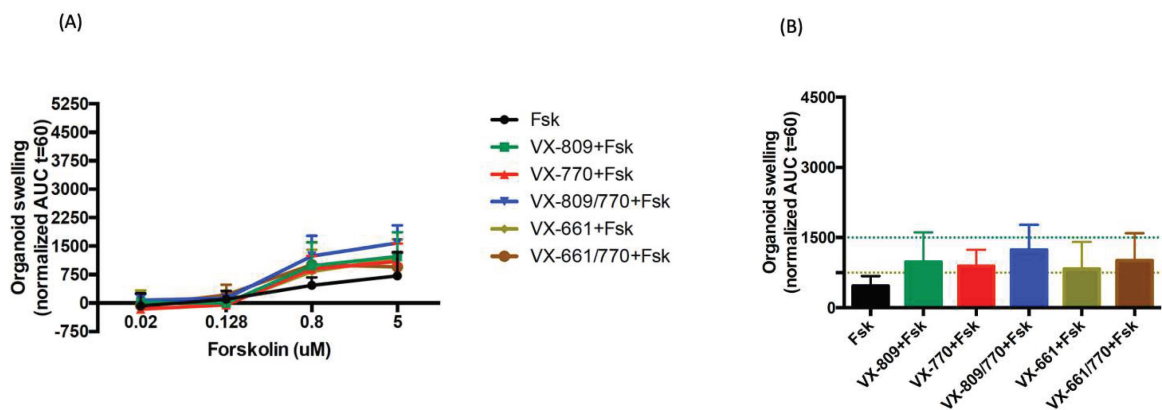
Obr. 6.21 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF11 (2789+5G>A/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná světlá a tmavě zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

Další pacient nesoucí mutaci 2789+5G>A, avšak v heterozygotní konstituci s mutací dele2,3(21kb), je pacient CF12. Analýza rektálních biopsií zmíněného pacienta prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (2,0 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.22).



Obr. 6.22 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF12 (2789+5G>A/dele2,3(21kb)). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 $\mu\text{M}/2 \mu\text{M}$, bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMXX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -1.451 \pm 0.305 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMXX/Fsk(Indo))} = -2.952 \pm 0.758 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. (2,0 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Raquel Centeio.

FIS assay pacienta CF12 neprokázala při koncentraci forskolinu 0,128 μM signifikantní bobtnání organoidů po přidání samotného potenciátoru či kombinace léčebných molekul. (Obr. 6.23)



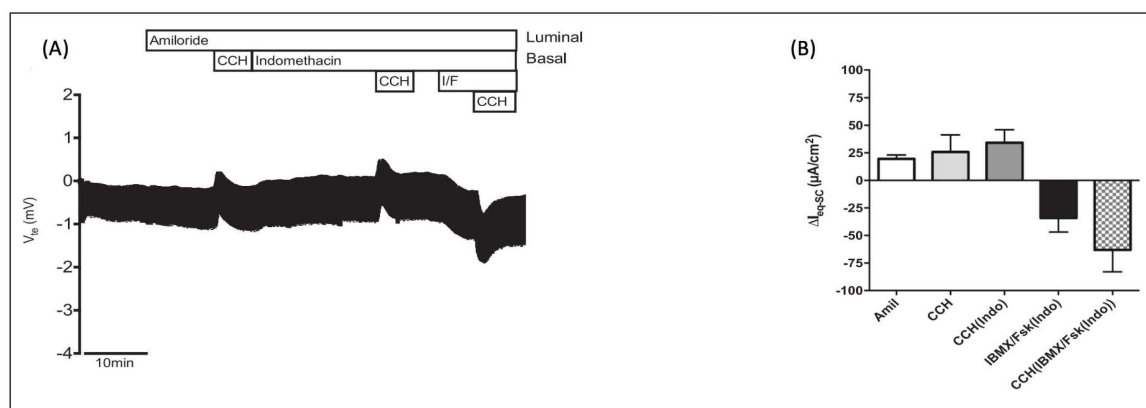
Obr. 6.23 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF12 (2789+5G>A/dele2,3(21kb)). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,8 μM . Tečkovaná světlá a tmavě zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva a Raquel Centeio.

6.4. Pacienti s velmi vzácnými mutacemi

6.4.1. S955P/F508del

Dalším pacientem, jehož vzorky jsme v rámci našeho projektu analyzovali, je pacient CF13 nesoucí mutaci F508del v heterozygotní konstituci s mutací S955P.

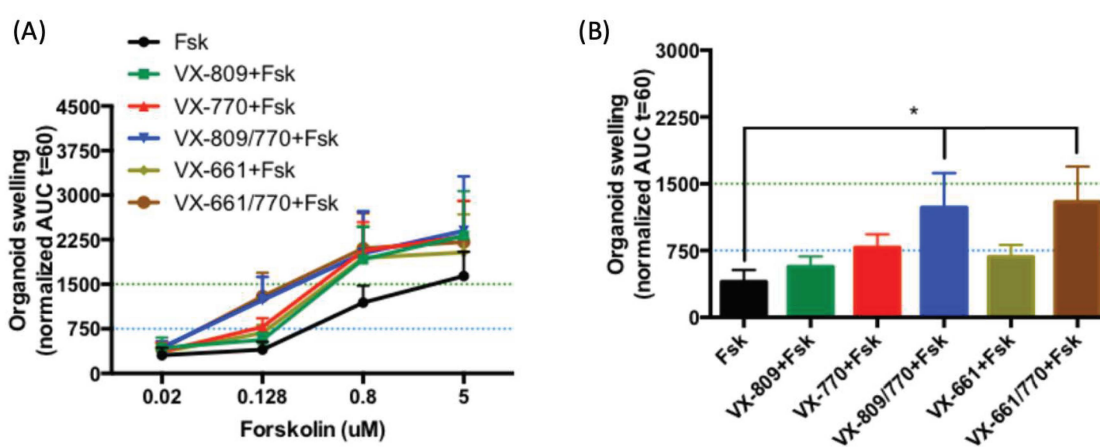
Jako první jsme provedli analýzu rektálních biopsií v Ussingově komůrce (Obr. 6.24). Vypočítaná průměrná maximální aktivace proteinu v porovnání se zdravou kontrolou byla v tomto případě 18 % funkce wt-CFTR.



Obr. 6.24 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích od pacienta CF13 (S955P/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně)

a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μM /2 μM , bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-scAmil}$), CCH ($\Delta I_{eq-scCCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -34.100 \pm 22.200 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = -63.200 \pm 34.100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$. (18 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

FIS assay pacienta CF13 prokázala při koncentraci forskolinu 0,128 μM signifikantní bobtnání po přidání kombinace VX-809/770 nebo VX-661/770 (Obr. 6.25). Míra bobtnání překročila v obou případech práh pro potenciální střední klinický benefit.

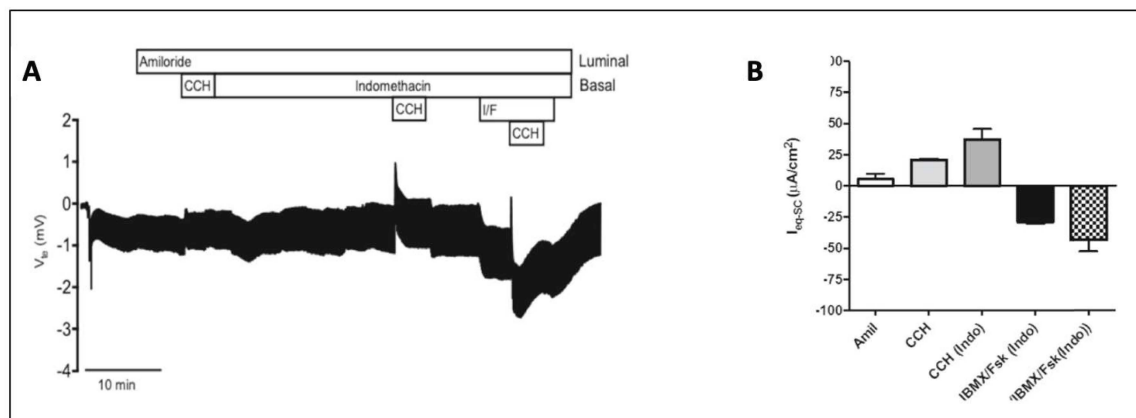


Obr. 6.25 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF13 (S955P/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline = 100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

6.4.2. 1717-2A>G/F508del

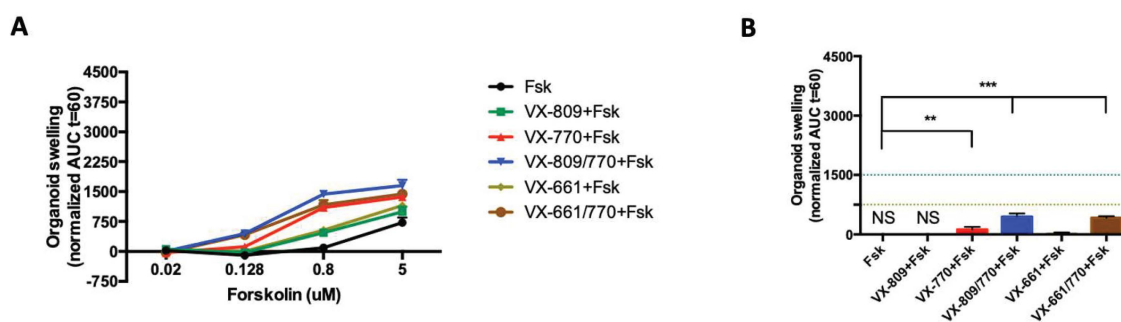
Dalším pacientem, jehož vzorky byly analyzovány, je pacient CF14 (genotyp 1717-2A>G/F508del).

Analýza rektálních biopsií pacienta CF14 prokázala profil charakteristický pro tkáň s reziduální funkcí CFTR proteinu (13 % funkce wt-CFTR) (Obr. 6.26).



Obr. 6.26 Výsledky z měření v Ussing chamber na rektálních biopsiích pacienta CF14 (1717-2A>G/F508del). (A) Reprezentativní záznam ukazuje vliv cholinergní (CCH, 100 μM , bazolaterálně) a cAMP-dependentní (IBMX/Fsk, I/F), 100 μM /2 μM , bazolaterálně) aktivace na změny transepiteliálního napětí (V_{te}). (B) Souhrn příslušných ekvivalentů proudu v uzavřeném okruhu (ΔI_{eq-sc}) pro Amil ($\Delta I_{eq-sc,Amil}$), CCH ($\Delta I_{eq-sc,CCH}$), CCH + Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)}$), IBMX/Fsk + Indo ($\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)}$) a CCH následující po aplikaci IBMX/Fsk/Indo ($\Delta I_{eq-sc,CCH(IBMX/Fsk(Indo))}$); data reprezentují průměr ze tří měření \pm SEM. $\Delta I_{eq-sc,IBMX/Fsk(Indo)} = -28.800 \pm 1.700 \mu A/cm^2$, $\Delta I_{eq-sc,CCH(Indo)} = -43.300 \pm 9.400 \mu A/cm^2$. (13 % funkce wt-CFTR). Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

FIS assay pacienta CF14 při koncentraci forskolinu 0,128 μM prokázala signifikantní odpověď po přidání samotného potenciátoru VX-770 a v ještě větší míře po přidání kombinace VX-809/VX-770 nebo VX-661/VX-770. Ani jedna odpověď však nedosahuje prahu pro potenciální střední klinický benefit (Obr. 6.27).



Obr. 6.27 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF14 (1717-2A>G/F508del). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,02, 0,128, 0,8 a 5 μM , vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidávané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 μM . Tečkovaná modrá a zelená čára zobrazují práh pro předpokládaný střední a vysoký klinický benefit pro pacienta. Hvězdička (*) označuje míru signifikance rozdílu vypočítaného pomocí nepárového one-way ANOVA s využitím Fisherova LSD (least significant difference) testu. * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Měření bylo provedeno ve spolupráci s Iris Silva.

Výsledky všech provedených analýz jsou shrnuty v Tab. 6.2.

Tab. 6.2 Souhrn výsledků všech provedených analýz na rektálních biopsiích a intestinálních organoidech: CFTR genotyp, kód pacienta, konečné potvrzení diagnózy CF a její formy, míra funkce CFTR proteinu (%- wt) měřená na rektálních biopsiích, míra záchrany funkce CFTR proteinu na intestinálních organoidech pro všechny pacienty při koncentraci forskolinu 0.128 μ M. Nasazení léčby modulátory CFTR proteinu (ano/ne, název přípravku). Hvězdička (*) označuje míru statistické významnosti v porovnání s kontrolou, * - hodnota $p < 0.05$, ** - hodnota $p < 0.01$, *** - hodnota $p < 0.001$. Ns = not significant, nesignifikantní. NA = not available, nedostupné.

CFTR genotyp	Kód pacienta	Diagnóza CF (fenotyp)	Funkce CFTR (% wt) (rektální biopsie)	Záchrana funkce CFTR proteinu (intestinální organoidy)					Responder na modulátory CFTR proteinu	Léčba modulátory CFTR proteinu
				VX-770	VX-809	VX-809/770	VX-661	VX-661/770		
F508del/ F508del	CF1	CF (klasická)	0	ns	ns	**	ns	**	Ano	Ne
F508del/ F508del	CF2	CF (klasická)	0	ns	ns	ns	ns	ns	Ne	Ne
F508del/ D1152H	CF3	CF (mírná)	35.5	***	ns	**	ns	***	Ano	Ano (Symkevi®)
D1152H/ N1303K	CF4	CF (mírná)	29.5	***	NA	NA	ns	***	Ano	Ne
D1152H/ N1303K	CF5	CF (mírná)	39.7	***	NA	NA	ns	***	Ano	Ne
F508del/ 3849+10kbC>T	CF6	CF (mírná)	4.2	ns	ns	*	ns	**	Ne	Ano (Symkevi®)
F508del/ 3849+10kbC>T	CF7	CF (mírná)	1.8	**	ns	***	ns	***	Ano	Ano (Symkevi®)
Dele2,3(21kb)/ 3849+10kbC>T	CF8	CF (mírná)	7.9	**	ns	***	ns	***	Ano	Ano (Symkevi®)
621+1G>T/ 3849+10kbC>T	CF9	CF (mírná)	6.6	NA					NA	Ne
F508del/ 2789+5G>A	CF10	CF (mírná)	5.5	**	ns	***	ns	**	Ano	Ne
F508del/ 2789+5G>A	CF11	CF (mírná)	1.5	ns	ns	ns	ns	ns	Ne	Ano (Symkevi®)
Dele2,3(21kb)/ 2789+5G>A	CF12	CF (mírná)	2.0	ns	ns	ns	ns	ns	Ne	Ne
F508del/ S955P	CF13	CF (mírná)	18.0	ns	ns	*	ns	*	Ano	Ne
F508del/ 1717-2A>G	CF14	CF (mírná)	13.0	**	ns	***	ns	***	Ne	Ne

7. DISKUZE

F508del/F508del

Mutace F508del představuje celosvětově nejčastější mutaci CFTR genu (frekvence 0,69744) (CFTR2.org, 2020). Tato delece v oblasti pro NBD1 je typicky spojena s klasickou (těžkou) formou onemocnění CF, tj. s významně zvýšenou koncentrací chloridů v potu, pankreatickou insuficiencí a těžkým progresivním postižením plic (Wang a Li, 2014). Neopomenutelnou skutečností je variabilita tíže fenotypu u pacientů nesoucích tuto mutaci nejen v heterozygotní, ale dokonce v homozygotní konstituci. Jako vysvětlení se zde nabízí role nekódujících variant v oblasti CFTR genu, jejichž přítomnost a vliv by mohly různorodost příznaků u jednotlivců nesoucích tuto mutaci vysvětlit (Knowles, 2015). Na mutaci F508del se soustředí největší pozornost v kontextu možné farmakologické záchrany, a právě pro tuto mutaci byly v době našeho projektu schváleny ke klinickému využití dvě kombinace korektoru a potenciátoru (VX-809/770 – Orkambi®, VX-661/770 – Symkevi®). Z klinických studií, které hodnotily léčebnou odpověď na výše zmíněné kombinace molekul vyplývá, že mimo responderů (tj. pacientů s klinicky významnou odpovědí) existují i non-respondeři (tj. pacienti s žádnou nebo minimální odpovědí). Tuto interindividuální variabilitu lze vysvětlit např. odlišným genetickým pozadím každého jednotlivého pacienta (Cutting, 2015). Měření na rektálních biopsiích u sourozenců CF1 (13 let) a CF2 (16 let) podporují diagnózu klasické formy CF (v obou případech 0 % funkce wt-CFTR). Oba pacienti jsou pankreaticky insuficientní (hodnoty FEE-1 $\mu\text{g/g}$ a 4 $\mu\text{g/g}$) a mají významně zvýšenou koncentraci chloridů v potu (v obou případech $> 110 \text{ mmol/l}$). Překvapivě však u obou přes jejich starší školní věk evidujeme klinicky mírné respirační symptomy s normálními hodnotami funkce plic (FEV_1 4,16 l (108% NH) a 3,09 l (89%NH)). Fenotyp organoidů a FIS assay pacienta CF2 ukazují na nulovou reziduální funkci CFTR proteinu. V jeho případě není patrný žádný záchranný efekt testovaných kombinací léčebných molekul při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM , nepředpokládáme tedy klinický benefit z nasazení přípravku Orkambi® nebo Symkevi®. V případě pacienta CF1 je však situace odlišná. Samotný fenotyp organoidů naznačuje možnou minimální reziduální funkci CFTR proteinu. Záchranný efekt testovaných kombinací léčebných molekul při referenční koncentraci forskolinu 0,128 μM téměř dosahuje prahu pro potenciální střední klinický benefit pro pacienta. Tento pacient by pravděpodobně mohl profitovat z nasazení léčby Orkambi® nebo Symkevi®.

Od srpna 2020 je k léčbě pacientů s CF k dispozici další modulátor CFTR proteinu (VX-445/661/770, Kaftrio®). Jedná se o kombinaci potenciátoru a dvou korektorů, jejíž účinnost byla v rámci klinických studií prokázána u pacientů nesoucích mutaci F508del v homozygotní, ale i heterozygotní konstituci (Heijerman et al., 2019; Middleton et al., 2019). Zmíněné klinické studie současně prokázaly vyšší účinnost přípravku Kaftrio® v porovnání s dosud dostupnými modulátory CFTR proteinu (Orkambi®, Symkevi®). V naší nově etablované laboratoři pro buněčné kultury jsme v roce 2020 provedli FIS assay na intestinálních organoidech 17 pacientů nesoucích mutaci F508del v homozygotní konstituci (v rámci projektu budou analyzovány vzorky obou sourozenců CF1 a CF2, výsledky zatím nejsou k dispozici). U 16 pacientů jsme v souladu s výsledky klinických studií prokázali vyšší míru léčebné odpovědi na kombinaci VX-445/661/770 (Kaftrio®) v porovnání s kombinací VX-661/770 (Symkevi®). U jednoho pacienta jsme přídatný efekt přidání korektoru VX-445 neprokázali. U tohoto pacienta jsme molekulárně genetickým vyšetřením potvrdili novou variantu CFTR genu, jejíž kauzalita k onemocnění CF zatím není objasněna. Domníváme se, že by se mohlo jednat o variantu s vlivem na cílové místo působení korektoru VX-445. Současně však nemůžeme vyloučit podíl genetického pozadí pacienta (genů modifikujících CF), které může léčebnou odpověď na dané molekuly modifikovat. Výsledky naší analýzy jsme publikovali jako vůbec první provedenou ex vivo predikci léčebné odpovědi na Kaftrio® s využitím intestinálních organoidů (Furstova et al., 2021). K potvrzení našich hypotéz je nutné provedení většího množství experimentů (do hodnocené skupiny budou zařazeni i pacienti CFL1 a CFL2), podtrhují však význam personalizace léčby pacientů s CF a princip theranostiky, díky které se k nejlepší možné kombinaci léčebných molekul dostane co nejširší spektrum pacientů s CF.

D1152H/F508del

Jednou z mutací, které byly u pacientů CF3, CF4 a CF5 molekulárně genetickým vyšetřením potvrzeny, je D1152H (frekvence 0,00402) (CFTR2.org, 2020). Jedná se o missense mutaci lokalizovanou v oblasti pro intracytoplazmatickou kličku spojující domény TMD12 a NBD2. Studie na transfektovaných COS-1 buňkách a oocytech *Xenopus laevis* prokázaly, že tato mutace není spojena s poruchou maturace CFTR proteinu a jeho vycestováním na plazmatickou membránu. Souvisí však s neadekvátní funkcí kanálku, jejíž příčinou je pouze částečná aktivace prostřednictvím c-AMP (Vankeerberghen et al., 1998). D1152H řadíme do IV. funkční třídy mutací a je spojena s vysokou reziduální funkcí CFTR proteinu (Burgel

et al., 2010). Podstatným faktem zůstává, že není konzistentně považována za mutaci způsobující CF s ohledem na poměrně nesouhlasné výsledky popisující její klinickou expresi (Burgel et al., 2010; Terlizzi et al., 2015). Vysvětlením velmi variabilního fenotypu by mohla být přítomnost D1152H v rámci komplexní alely, jak je tomu u jiných mutací CFTR genu (Bell et al., 2015). V databázi CFTR2 je mutace D1152H popisována jako varianta s variabilní klinickou konsekvencí (CFTR2.org, 2020).

Měření na rektálních biopsiích pacienta CF3 prokázalo vysokou reziduální funkci CFTR proteinu (35,5 % funkce wt-CFTR). Věk pacienta byl v době analýzy 40 let, diagnóza CF byla v jeho případě stanovena až ve věku 23 let na základě chronických respiračních infekcí a přítomnosti bronchiektázií na HRCT plic (pozn. v době narození pacienta nebyl dostupný novorozenecký screening CF). Biomarkery funkce CFTR proteinu jako koncentrace chloridů v potu (51,0 mmol/l) a pankreatická suficience (FEE-1 1020 µg/g) podporují domněnku, že se jedná o pacienta s mírnou formou CF. Ovšem přítomnost středně těžké obstruktivní ventilační poruchy (FEV₁ 1,76 l (61 %NH)), chronická kolonizace dýchacích cest *Pseudomonas aeruginosa*, anamnestický záchyt *Mycobacterium avium* intracellulare a meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* by spíše svědčily pro klinicky těžší fenotyp onemocnění. V případě tohoto pacienta je možné brát v úvahu variabilitu způsobenou genetickým pozadím, resp. přítomností genů modifikujících CF. Ani opakovaná sekvenace CFTR genu neodhalila přítomnost komplexní alely či jiné varianty, které by závažný fenotyp onemocnění vysvětlily. Fenotyp intestinálních organoidů pacienta za bazálních podmínek připomíná obraz organoidů zdravé kontroly. Intestinální organoidy pacienta CF3 dosáhly při koncentraci forskolinu 0,128 µM signifikantního bobtnání po přidání všech testovaných léčebných molekul. Analýzou rozptylu jednoduchého třídění s využitím Fisherova LSD testu jsme neprokázali signifikantní rozdíl mezi efektem kombinované léčby a samotným potenciátorem ($p = 0,7460$ pro VX-809/770 a $p = 0,7157$ pro VX-661/770). Vzestup funkce CFTR proteinu je tedy v tomto případě dán účinkem potenciátoru na alelu D1152H, nikoliv účinkem korektoru na alelu F508del. Výše uvedené výsledky podporují zařazení D1152H do IV. funkční třídy mutací. Dále lze na základě naší analýzy předpokládat, že při nasazení léčby modulátory CFTR proteinu bude pacient profitovat z léčby přípravkem Kalydeco®. D1152H byla nejprve v roce 2018 na základě in vitro studií zařazena mezi 38 mutací s reziduální funkcí, pro které byla schválena léčba přípravkem Kalydeco® institucí FDA (Durmowicz et al., 2018). Později však byla u pacientů nesoucích na druhé alele mutaci F508del prokázána vyšší efektivita nasazení přípravku Symkevi® (Rowe et al., 2017). V

roce 2020 byl přípravek Symkevi® nasazen našemu pacientovi, klinický efekt je zatím obtížné po 9 měsících léčby hodnotit.

D1152H/N1303K

Sourozenci CF4 a CF5 nesou na druhé alele mutaci N1303K (frekvence 0,01581) (CFTR2.org, 2020). Jedná se o missense mutaci lokalizovanou v oblasti pro NBD2, která vede k narušení správné maturace s vycestováním proteinu k plazmatické membráně. Z tohoto důvodu je řazena mezi mutace II. funkční třídy (DeStefano et al., 2018). Výsledky analýzy rektálních biopsií ukazují vysokou míru reziduální funkce CFTR proteinu u obou pacientů (29,5 % a 39,7 % funkce wt-CFTR). Oba sourozenci jsou pankreaticky suficientní (FEE-1 497 µg/g a 1036 µg/g) a mají normální nebo hraničně zvýšenou koncentraci chloridů v potu (CFL4 21 mmol/l a CFL5 37 mmol/l). Pacient CF4 byl diagnostikován na podkladě novorozeneckého screeningu, pacient CF5 následně po zjištění diagnózy u mladšího sourozence ve věku 3 let. Diagnózu CF podporují v obou případech recidivující respirační infekce a opakovaný záchyt *Pseudomonas aeruginosa* v anamnéze. U obou pacientů se opakovaně vyskytují prolapsy rekta. Hodnoty funkce plic byly u obou sourozenců v době analýzy vzorků v normě (FEV₁ 1,74 l (104 %NH) a 1,92 l (111 %NH)). Je nutné brát v úvahu věk obou pacientů v době analýzy (7 a 8 let) a skutečnost, že se příznaky onemocnění CF v jejich případě mohou ve větší míře projevit až v pozdějším věku. Svou roli na dobrém klinickém stavu v době analýzy mohla sehrát časná diagnostika onemocnění a pravidelné sledování obou pacientů (oba denně inhalují solný roztok a provádějí fyzioterapii, užívají suplementaci vitaminů rozpustných v tucích, respirační infekce jsou důsledně léčeny antibiotiky, je pravidelně monitorována kolonizace dýchacích cest s cílenými eradikacemi příslušných patogenů). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek připomíná organoidy zdravé kontroly. Dle provedených FIS assay byl vzestup funkce CFTR proteinu v obou případech dán účinkem potenciátoru na alelu D1152H, nikoliv účinkem korektoru na alelu N1303K (účinek korektoru lze na základě dostupných studií očekávat pouze v případě mutace F508del). Míra bobtnání se pohybovala nad prahem pro potenciální vysoký klinický benefit pro pacienta. Oba sourozenci by mohli na základě námi provedených *ex vivo* studií v budoucnu profitovat z nasazení léčby Kalydeco® nebo Symkevi®. Pro pacienty nesoucí

mutace s reziduální funkcí v heterozygotní konstituci s jinou mutací, než F508del však zatím léčba dostupnými modulátory CFTR proteinu schválena nebyla.

3849+10kbC>T/F508del nebo jiná

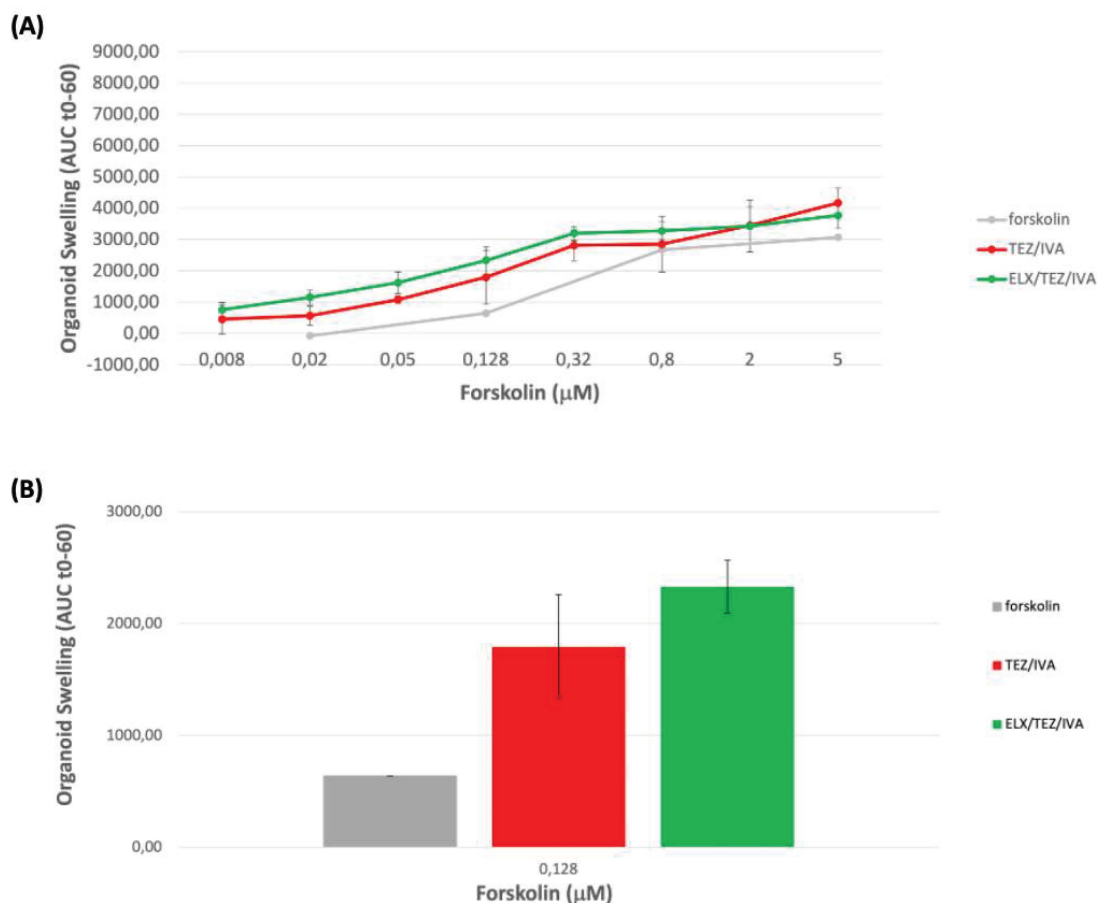
3849+10kbC>T (frekvence 0,00815) (CFTR2.org, 2020), splicing mutace řazená do V. funkční třídy, vede k tvorbě alternativního místa pro sestřih v intronu 19. Následkem je inserce nového pseudoexonu o rozsahu 84bp u většiny CFTR transkriptů. Tento pseudoexon obsahuje ve svém čtecím rámci mezi exony 19–20 stop kodon (Highsmith et al., 1994). 3849+10kbC>T dává vznik jak normálně, tak abnormálně sestřiženým CFTR transkriptům, množství normální CFTR mRNA koreluje se závažností histopatologických změn v různých orgánech (Chiba-Falek et al., 1999). Obecně je tato mutace spojena s mírnější formou onemocnění CF, normální nebo lehce zvýšenou koncentrací chloridů v potu, pankreatickou suficiencí a různou mírou plicních či gastrointestinálních obtíží (Gilbert et al., 1995). Oba sourozenci byli diagnostikováni ve školním věku (CF6 v 11 letech po diagnóze staršího sourozence a CF7 v 9 letech věku na podkladě opakovaných respiračních infekcí). Oba mají lehce zvýšenou koncentraci chloridů v potu (CFL6 46 mmol/ a CFL7 39 mmol/l) a jsou pankreaticky sufficientní (FEE-1 573 µg/g a 2400 µg/g). Odlišná byla míra plicního postižení v době analýzy vzorků: V případě pacienta CF6 jsme registrovali jen mírnou obstrukční ventilační poruchu (FEV₁ 2,35 l (74 %NH)) s chronickou kolonizací *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia*, v případě pacienta CF7 byla přítomna těžká obstrukční porucha ventilace (FEV₁ 1,5 L (45 %NH)) s chronickou kolonizací dýchacích cest stejnými patogeny. Pacient CF7 byl současně špatného stavu výživy (BMI 18,6 kg/m²). Profil záznamu měření na rektálních biopsiích svědčí v případě pacienta CF6 pro reziduální funkci CFTR proteinu (4,2 % funkce wt-CFTR). V případě pacienta CF7 maximální průměrná aktivace CFTR proteinu v porovnání se zdravou kontrolou dosahuje nižších hodnot (1,8 % funkce wt-CFTR). Fenotyp organoidů obou pacientů mají za bazálních podmínek fenotyp organoidů s přítomnou reziduální funkcí CFTR proteinu. Dále pozorujeme signifikantní záchranu funkce CFTR proteinu přidáním kombinace VX-809/770 i VX-661/770 (vzájemně se signifikantně neliší, druhá zmiňovaná kombinace však téměř dosahuje prahu pro potenciální vysoký klinický benefit pro pacienta). Pacient CF6 by mohl klinicky profitovat z nasazení přípravku Orkambi® nebo lépe Symkevi®. Pro pacienta CF7 pozorujeme velmi podobný profil odpovědí. Také pacient CF7 by mohl klinicky profitovat z nasazení přípravku Orkambi® nebo Symkevi®. U pacienta CF6 pozorujeme podle míry odpovědi vyšší

reziduální aktivitu CFTR proteinu v porovnání s pacientem CF7. Rozdílnost výsledků z provedených měření na rektálních biopsiích, kterou pozorujeme mezi těmito dvěma sourozenci lze vysvětlit odlišným poměrem normálně/abnormálně sestřižených CFTR transkriptů u každého z nich a současně také odlišnou mírou celkové exprese CFTR proteinu. Tento fakt by mohl být vysvětlením i pro odlišný charakter odpovědi ke kombinační léčbě, která má současně vliv na alelu F508del, pro jejíž záchranu byly původně tyto léky koncipovány. Určitou roli nejen v rozdílnosti výsledků námi provedených analýz, ale také v tíži klinického průběhu onemocnění může mít genetické pozadí každého z pacientů (geny modifikující CF). Léčba přípravkem Symkevi® byla pro pacienty nesoucí mutaci 3849+10kbC>T v heterozygotní konstituci s mutací F508del již schválena ke klinickému použití (Rowe et al., 2017). Pacientovi CF6 byl počátkem roku 2020 do léčby nasazen přípravek Symkevi®, po 9 měsících léčby evidujeme určité zlepšení hodnot plicních funkcí (vývoj FEV₁ 71–78–74–75–83 % NH). Pacientovi CF7 byl přípravek Symkevi® v roce 2020 také nasazen, bohužel tento pacient zemřel v průběhu ledna 2021 v důsledku respiračního selhání při infekci Covid-19.

Dele2,3(21kb) (frekvence 0,00294) (CFTR2.org, 2020) je mutace způsobující delecii v rozsahu 21.080 bp, která překlenuje oblast intronů 1.–3. Analýzy CFTR mRNA transkriptů na buňkách nosního epitelu pacientů nesoucích tuto mutaci prokázaly, že vede ke ztrátě exonů 2 a 3 s předčasným ukončením tvorby mRNA uvnitř exonu 4. Je klasifikována jako mutace I. funkční třídy (nebo také nově VII. funkční třídy, tzv. nezachranitelné pro absenci CFTR mRNA) a je typicky asociovaná s klasickým fenotypem CF (Dörk et al., 2000). Analýza rektálních biopsií pacienta CF8 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (v tomto případě 7,9 % funkce wt-CFTR). S ohledem na klinické údaje: jedná se o pacienta, kterému byla diagnóza CF stanovena ve věku 3 měsíců na podkladě bronchopneumonie (novorozenecký screening nebyl v době narození k dispozici). Pacient měl opakovaně abnormální koncentraci chloridů v potu (60 mmol/l) a opakovaně normální hodnoty fekální elastázy-1 (FEE-1 568 µg/g...500 µg/g) svědčící pro pankreatickou suficienci. V době analýzy vzorků (ve věku 10 let) jsme registrovali středně těžkou obstrukční ventilační poruchu (FEV₁ 1,54 l (75 %NH)), na HRCT již byly známky bronchiektázií a pacient byl chronicky kolonizován *Staphylococcus aureus* s opakovanými akutními exacerbacemi základního onemocnění. Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má charakter organoidů s reziduální funkcí CFTR proteinu. FIS assay v případě pacienta CF8 prokázala signifikantní záchranu funkce CFTR proteinu nejen přidáním samotného potenciátoru VX-770, ale ve větší míře přidáním obou kombinací léčebných molekul (tj. VX-809/770 nebo VX-661/770).

Míra bobtnání organoidů dosahuje ve všech případech prahu pro potenciální vysoký klinický benefit. Tento pacient by mohl významně profitovat z nasazení léčby Kalydeco®, Orkambi® nebo Symkevi®. Jak již bylo zmíněno výše, léčba dostupnými modulátory CFTR proteinu je prozatím schválena pouze pro pacienty nesoucí mutaci 3849+10kbC>T v heterozygotní konstituci s mutací F508del. Přesto jsme na podkladě výše uvedených výsledků požádali o výjimku pro schválení léčby přípravkem Symkevi® pro našeho pacienta. Lék užívá od druhé poloviny roku 2020. Již nyní, po 6 měsících léčby, došlo ke zlepšení funkce plic (vývoj FEV₁ 75–92–104 % NH), pacient je v klinicky dobrém stavu a zatím neprodělal žádnou další akutní exacerbaci základního onemocnění.

Mutace 621+1G>T (frekvence 0,00931) (CFTR2.org, 2020) aktivuje alternativní místo sestřihu v oblasti exonu 4, nebo vede k jeho kompletnímu vynechání. Analýza buněk nosního epitelu pacientů nesoucích tuto mutaci prokázala, že výsledkem je téměř úplné chybění správně sestřižených CFTR transkriptů (Hull et al., 1993; Castellani et al., 2008). Tato mutace je řazena do I. funkční třídy a je typicky spojena s klasickou formou CF (Witt et al., 1996). Analýza rektálních biopsií pacienta CF9 prokázala reziduální funkci CFTR proteinu (6,6 % funkce wt-CFTR). Tento pacient byl diagnostikován v 5 letech věku na podkladě bronchopneumonie (novorozenecký screening nebyl v době narození k dispozici). Koncentrace chloridů v potu byla opakovaně abnormální (79...84 mmol/l), hodnoty fekální elastázy-1 ve stolici (FEE-1 1200 µg/g) svědčí pro dostatečnou zevně sekretorickou funkci pankreatu. Pacient se bohužel vzhledem k sociálním okolnostem ztratil na přechodnou dobu z našeho sledování, v pravidelné dispenzární péči jej znovu evidujeme od roku 2018 (věk 14 let). Přes pankreatickou suficienci je špatného stavu výživy (BMI 14 kg/m²), vzhledem k těžkému poškození chronickým zánětem bylo nutné v roce 2018 přistoupit k pravostranné pneumonektomii. Operační výkon jeho stav stabilizoval, progreduje však deformita hrudníku a bronchiektázie v levé plicí. Z tohoto důvodu pacienta připravujeme k zařazení na WL k transplantaci plic. V naší nově etablované laboratoři pro tkáňové kultury jsme založili kultury organoidů a provedli FIS assay (Obr. 7.1). Prokázali jsme signifikantní odpověď na dostupné modulátory CFTR proteinu (Symkevi a Kaftrio). Stejně jako v případě pacienta CF8 se pokusíme o nasazení příslušné léčby na podkladě *ex vivo* predikce.



Obr. 7.1 Výsledky FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF9 (3849+10kbC>T/621+1G>T). (A) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,008, 0,02, 0,05, 0,128, 0,32, 0,8, 2 a 5 µM, vyjádřené jako bobtnání organoidu (organoid swelling) nebo také vzestup plochy organoidu pod křivkou (normalized AUC, baseline =100 %, t = 60 min). (B) Kvantifikace FIS pro všechny přidané léčebné molekuly při koncentraci Fsk 0,128 µM. Měření provedla E. Fürstová.

2789+5G>A/F508del nebo jiná

2789+5G>A (frekvence 0,00723) (CFTR2.org, 2020) je splicing mutace vedoucí k narušení místa sestřihu v oblasti exonu 14b, a tím k jeho vynechání. Výsledkem je posun čtecího rámce CFTR mRNA s časným ukončením tvorby CFTR proteinu. Analýzou buněk nosního epitelu pacientů nesoucích tuto mutaci bylo prokázáno, že tato alela může vést k tvorbě malého množství normální CFTR mRNA, které je v případě některých pacientů spojeno s mírnější formou CF. Typicky je tato mutace spojena s pankreatickou suficiencí, zvýšenou hladinou chloridů v potu a je klasifikována jako mutace V. funkční třídy (Highsmith et al., 1997). Analýza rektálních biopsií pacientů CF10 a CF11 podporuje diagnózu mírné formy CF v obou případech (5,5 % resp. 1,5 % funkce wt-CFTR). S ohledem na klinická data: diagnóza CF byla u pacienta CF10 stanovena v 1. roce věku na podkladě bronchopneumonie (novorozenecký screening nebyl v době narození obou pacientů k dispozici). Pacient měl

zvýšenou koncentraci chloridů v potu (78 mmol/l), opakovaně normální hladiny fekální elastázy-1 ve stolici (FEE-1 654 a 516 $\mu\text{g/g}$) svědčící pro pankreatickou insuficienci. V době analýzy vzorků (ve věku 37 let) byl chronicky kolonizován *Burkholderia cepacia*, dobrého stavu výživy (BMI 32 kg/m^2), dle spirometrických měření jsme registrovali pouze mírnou obstrukční ventilační poruchu (FEV_1 3,04 l (81 % NH)). Pacientovi CF11 byla diagnostikována CF již při narození po stanovení diagnózy u staršího sourozence. I v jeho případě byla prokázána zvýšená koncentrace chloridů v potu (91 mmol/l) a normální hladina fekální elastázy-1 ve stolici (FEE-1 371...520 $\mu\text{g/g}$) spojená s pankreatickou suficiencí. V době analýzy vzorků (ve věku 36 let) byl stejně jako starší sourozenec kolonizován *Burkholderia cepacia*, vykazoval horší stav výživy (BMI 21 kg/m^2) a dle spirometrických měření jsme v jeho případě registrovali těžkou obstrukční ventilační poruchu (FEV_1 1,47 l (50 %NH)). Fenotyp onemocnění v případě obou pacientů koreluje s výsledky našeho měření. Vyšší reziduální funkci CFTR proteinu jsme prokázali analýzou rektálních biopsií a FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF10. Organoidy pacienta CF10 signifikantně bobtnají po přidání samotného potenciátoru či kombinace léčebných molekul. Prahu pro potenciální střední klinický benefit dosahují po přidání kombinace VX-661/770 nebo více VX-809/770. Předpokládáme, že tento pacient bude klinicky profitovat z nasazení léčby Orkambi® nebo Symkevi®. V případě pacienta CF11 FIS assay na intestinálních organoidech neprokázala signifikantní bobtnání ani v jednom případě. Jedná se opět o velmi dobrý příklad vlivu genetického pozadí, které může potenciálně modifikovat nejen klinický fenotyp onemocnění CF, ale také odpověď na dostupné léčebné molekuly. Podstatným faktem opět je, že pro pacienty nesoucí mutaci 2789+5G>A v heterozygotní konstituci s mutací F508del již byl schválen ke klinickému použití přípravek Symkevi® (Rowe et al., 2017). Pacient CF10 zatím s jeho nasazením vyčkává (je v dobrém klinickém stavu, s jen mírnou obstrukční ventilační poruchou (FEV_1 79 %NH), bez akutních exacerbací základního onemocnění). Pacientovi CF11 lék nasazen byl, nyní po 9 měsících léčby zatím nevykazuje významné klinické zlepšení (vývoj hodnot FEV_1 59–57–54–52 % NH), což odpovídá *ex vivo* predikci z provedené FIS assay.

V případě pacienta CF12 prokázala analýza rektálních biopsií reziduální funkci CFTR proteinu (2,0 % funkce wt-CFTR), za níž je v tomto případě zodpovědná alela 2789+5G>A (alela délky 2,3(21kb) vede k absenci CFTR mRNA). Určité míře reziduální funkce CFTR proteinu odpovídá i klinický fenotyp onemocnění. Pacient CF12 byl diagnostikován ve věku

5 let na podkladě opakovaných respiračních infekcí (novorozenecký screening nebyl v době narození k dispozici). Měl opakovaně zvýšenou koncentraci chloridů v potu (100–101 mmol/l) a normální hodnoty fekální elastázy-1 ve stolici (FEE-1 1710–4380 µg/g) svědčící pro pankreatickou suficienci. V době analýzy (ve věku 10 let) klinickému obrazu dominovaly příznaky rhinosinuitidy, pacient vykazoval na spirometrii normální hodnoty funkce plic (FEV₁ 2,65 (123 %NH)). Fenotyp organoidů za bazálních podmínek má charakter organoidů pacienta s reziduální funkcí CFTR proteinu. Provedená FIS assay pacienta CF12 však neprokázala při koncentraci forskolinu 0,128 µM signifikantní bobtnání organoidů. V případě tohoto pacienta nelze na základě naší predikce očekávat klinický benefit z léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu.

S955P

S955P (záměna T > C na pozici c.2863 v exonu 17) je nová, doposud necharakterizovaná mutace CFTR genu. V jejím případě dochází k záměně serinu prolinem na pozici 955 v oblasti cytoplazmatické části transmembránového helixu 8 (TM8), který se nachází v těsné blízkosti cytoplazmatické kličky 3 (ICL3) (spojuje zde doménu NBD2 s doménou TMD2) (Hwang et al., 2018). K podrobnější charakteristice mutace S955P za účelem posoudit vycestování proteinu k plazmatické membráně, jeho otevírání a stabilitu nezávisle na alele F508del, jsme využili kromě intestinálních organoidů i buněčný model (buněčnou linii CFBE41o- vytvořenou pomocí S955P-CFTR cDNA (všechny metody popsány v námi publikovaném článku I. Silva, T. Doušová et al., 2020). Pomocí western blot analýzy intestinálních organoidů a S955P-CFTR CFBE buněk jsme prokázali, že mutace S955P nemá vliv na vycestování CFTR proteinu k buněčné membráně, jelikož vede k expresi proužku C. Tento nálezn je konzistentní s relativně vysokou reziduální funkcí CFTR proteinu na rektálních biopsiích (~ 18 % funkce wt-CFTR), intestinálních organoidech i CFBE buňkách (Silva et al., 2020). Přítomnost S955P CFTR v plazmatické membráně byla současně potvrzena konfokální mikroskopií na 3D intestinálních organoidech pacienta CF13. Pomocí jednokanálového záznamu metodou patch clamp jsme na S955P-CFBE buňkách prokázali normální vedení kanálem se sníženou pravděpodobností jeho otevírání (50 % v porovnání se zdravou kontrolou) (Silva et al., 2020). Získaná data jsou konzistentní s tvrzením, že se v případě S955P jedná o mutaci III. funkční třídy. Fakt, že se CFTR protein při western blot analýze intestinálních organoidů objevuje v daleko menším množství, nežli v případě zdravé kontroly naznačuje, že je protein nestabilní. Na základě tohoto zjištění by

bylo možné mutaci S955P zařadit současně do VI. funkční třídy mutací (příkladem podobné mutace je Q1412X) (Haardt et al., 1999). FIS assay na intestinálních organoidech pacienta CF13 prokázala signifikantní efekt přidané kombinace VX-809/770 nebo VX-661/770. Míra bobtnání překročila práh pro potenciální střední klinický benefit, tento pacient by mohl profitovat z nasazení léčby Orkambi® nebo Symkevi®. Z klinického pohledu se jedná o 7letého chlapce s pozitivním novorozeneckým screeningem na CF (IRT: 118 ng/ml), mírně zvýšenou koncentrací chloridů v potu (51; 55 mmol/l), pankreatickou suficiencí (FEE-1 431 µg/g) a dobrým stavem výživy (BMI 14 kg/m²; -0,96 SD). Opakovaně byla zachycena bakteriální flora v horních cestách dýchacích (Haemophilus influenzae, S. aureus a S. pneumoniae) bez epizod akutních exacerbací základního onemocnění. Spirometrické vyšetření vykazovalo normální hodnoty funkce plic: FVC 1,63 l (88 % NH), FEV1 1,60 l/s (99 % NH), MEF50 2,40 l/s (100 % NH).

1717-2A>G

Mutace 1717-2A>G (intronická záměna A>G na druhé pozici akceptoru IVS11) má za následek aberantní sestřih a tvorbu dvou forem CFTR transkriptů: jednoho zahrnujícího navíc 6 nukleotidů mezi exony 11 a 12 a druhého zcela přeskakujícího exon 12, přičemž oba tyto CFTR transkripty vedou k předčasnému zařazení terminačního kodonu (PTC) a ukončení translace (Sharma et al., 2014). Přes dostupná poznání z in vitro studií nebyl klinický fenotyp této mutace a její efekt na tkáň pacienta doposud dostatečně popsán. Mutace 1717-2A>G byla kromě našeho pacienta popsána u jednoho pacienta v Rumunsku, také v pozici trans s mutací F508del (Popa et al., 1997). Další analýzou intestinálních organoidů pacienta CF14 (metody popsány v naší publikovaném článku I. Silva, T. Doušová et al., 2020) jsme prokázali přítomnost obou forem CFTR transkriptů. Jejich nízké množství lze přisuzovat degradaci cestou NMD (nonsense mediated decay). Analýzou mRNA jsme dále prokázali velmi malé množství (~ 0,2 %) plnohodnotných (wt-CFTR) transkriptů pocházejících z alely 1717-2A>G. Tímto nálezem by bylo možné vysvětlit reziduální funkci CFTR proteinu, kterou jsme prokázali měřením na rektálních biopsiích i intestinálních organoidech pacienta. I přes velmi malé, vedlo množství wt-CFTR mRNA k produkci normálního CFTR proteinu (v množství < 10 % wt-CFTR), což jsme potvrdili western blot analýzou CFTR proteinu exprimovaného na intestinálních organoidech a dále imunohistochemicky pomocí konfokálního mikroskopu. Na základě všech provedených analýz můžeme 1717-2A>G zařadit do V. funkční třídy mezi mutace, které vedou

k významně sníženému množství CFTR proteinu v plazmatické membráně (Silva et al., 2020). FIS assay pacienta CF14 prokázala signifikantní odpověď po přidání samotného potenciátoru VX-770 i kombinace VX-809/VX-770 nebo VX-661/VX-770. Ani jedna odpověď však nedosahuje prahu pro potenciální střední klinický benefit. Tento pacient pravděpodobně nebude klinicky profitovat z nasazení léčby dostupnými modulátory CFTR proteinu. Z klinického pohledu se jedná o 4letého chlapce, kterému byla diagnóza CF stanovena na základě pozitivního novorozeneckého screeningu (IRT 161 ng/ml). V době diagnózy měl zvýšenou koncentraci chloridů v potu (78 mmol/l) a byla prokázána pankreatická insuficience (FEE-1 14 µg/g). Pacient byl v době analýzy dobrého stavu výživy (BMI 19 kg/m²; 2,3 SD) a neměl příznaky plicního postižení. Přítomna byla intermitentní kolonizace *P. aeruginosa* a *S. aureus*. Hodnoty plicních funkcí bylo obtížné hodnotit vzhledem k nízkému věku dítěte (FVC 1,05 l (89 % NH), FEV₁ 1,05 l/s 105 % NH), MEF50 1,72 l/s (102 % NH).

Výsledky měření v Ussingově komůrce jsme dále analyzovali jako součást mezinárodní kohorty celkem 143 pacientů s CF. Parametr $I_{sc-1/F/C}$ byl na základě dosud provedených studií určen jako nejlépe korelující s klinickými příznaky CF, a tím i využitelný k odlišení zdravých jedinců od pacientů s CF (Mall et al., 2000; Mall et al., 2004; Sousa et al., 2012). Tento parametr jsme v námi publikovaném článku (Silva et al., 2020) porovnali s dalšími, které lze extrahovat přímo ze záznamu měření na rektálních biopsiích a provedli jsme jejich korelaci s klinickými příznaky CF. V porovnání s dosud užívaným parametrem ($I_{sc-1/F/C}$) vykazoval jeden parametr vyšší míru korelace s koncentrací chloridů v potu, hodnotou FEV₁, FVC, BMI a fekální elastázy-1. Jedná se o parametr $V_{1/F+1/F/C}$, který odpovídá maximální aktivaci CFTR proteinu. Parametr $V_{1/F+1/F/C}$ koreluje lépe se závažností klinických příznaků onemocnění a je využitelný ke stanovení prahu vedoucího k rozlišení pacientů s klasickou nebo mírnou formou CF a zdravých jedinců. (Silva et al., 2020) Možným vysvětlením může být fakt, že k výpočtu ekvivalentu proudu v uzavřeném okruhu (I_{eq-sc}) je nezbytná transepiteliální rezistence (R_{te}), jejíž hodnota může být negativně ovlivněna kvalitou analyzované tkáně (špatná příprava střeva, zánětlivý proces ve střevě, mechanické narušení tkáně endoskopickými kleštěmi). Uspokojivá kvalita tkáně je vlastně limitujícím faktorem protokolu měření v Ussingově komůrce a může mít na výsledek analýzy obrovský dopad (narušená rezistence tkáně vede k nedostatečným nebo nižším než očekávaným odpovědím na přidané látky, které mohou mít za následek nesprávné hodnocení záznamu).

8. 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.

9. ZÁVĚR

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. Doktorand v rámci svého PhD. studia organizoval výběr pacientů vhodných k analýze. Dále se podílel na odběrech rektálních biopsií, jejich transportu do laboratoře a následném zpracování ve formě měření v Ussingově komůrce a tvorby organoidových kultur s provedenou FIS assay. Data získaná analýzami rektálních biopsií a intestinálních organoidů statisticky zpracovával a vyhodnocoval výsledky projektu.

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 modulátorové léčby.

10. SOUHRN

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. Známost 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 modulatorové 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 reaktibilitu 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®). 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.

Součástí našeho projektu byly analýzy měření v Ussingově komůrce. V rámci mezinárodní kohorty pacientů s CF jsme porovnali parametr ($I_{sc-1/F/C}$), 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 ($V_{1/F} + 1/F/C$) odpovídá maximální aktivaci CFTR proteinu a koreluje lépe se závažností klinických příznaků onemocnění. Je tedy využitelný k rozlišení pacientů s klasickou nebo mírnou formou CF a zdravých jedinců.

Široké spektrum mutací CFTR genu zahrnuje více nebo méně vzácné varianty. Některé z těchto variant mají velmi variabilní klinickou konsekvenci, u části z nich doposud nebyl popsán přesný mechanismus vzniku defektního proteinu. Každá z těchto variant postihuje celosvětově pouze malou skupinu jedinců, proto je v těchto případech obtížné predikovat průběh a tíži samotného onemocnění. Velkou výzvou je v těchto případech nejen diagnostika samotného onemocnění, ale současně i predikce možného léčebného potenciálu již dostupných modulátorů CFTR proteinu. Klasická klinická studie, která by stanovila případný účinek nového léku u těchto pacientů je kvůli jejich malému počtu neproveditelná. 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. Podstatná zde zůstává snaha o maximální poznání molekulárního mechanismu zodpovědného za vznik defektního CFTR proteinu. Tento systém by mohl vytvořit základ pro maximálně efektivní, personalizovanou léčbu co nejširší skupiny pacientů s CF a translaci výzkumu do klinické praxe.

11. SUMMARY

As part of our project, we analyzed samples from 14 patients in whom a total of 9 different CFTR mutations were confirmed. Using native tissue and cell cultures derived from the patient's native tissue, diagnosis of CF was confirmed in all examined individuals (classic form in 2 cases, atypical form in 12 cases). Furthermore, using the above-mentioned experimental methods, we tried to determine as accurately as possible the level of individual CFTR function and to predict the therapeutic response to available CFTR modulating drugs. The first evaluated group included patients carrying mutations causing the classic form of CF. It was a sibling pair carrying the F508del mutation in a homozygous constitution. A known fact is the observed variability in the severity of the phenotype and the response to treatment molecules in patients carrying this mutation not only in heterozygous but also in the homozygous constitution. The role of non-coding variants in the CFTR gene region is suggested as an explanation (Cystic Fibrosis Trust, 2016; Berkers et al., 2019). The F508del mutation is also receiving the most attention in context of searching for possible pharmacological rescue. At the time of our project, two combinations of corrector and potentiator (VX-809/770 – Orkambi® and VX-661/770 – Symkevi®) were approved for clinical use for patients carrying the F508del mutation in homozygous constitution. Analysis of native tissue and cell cultures confirmed the minimal residual function of CFTR protein in both patients. Despite minimal residual function, the FIS assay on intestinal organoids has shown interindividual variability in response to available treatment molecules. However, we do not anticipate clinical benefit from the CFTR modulator therapy in either case. Patients with one or two mutations with clinically variable phenotype of CF were enrolled as a part of the second study group. These are rare mutations (~ 1–4% incidence) in which the level of residual CFTR function is decisive not only for the resulting phenotype of the disease, but also for the expected effect of the available treatments. At the time of our project, treatment with potentiator alone (VX-770, Kalydeco®) was first approved for patients carrying mutations with residual function (Vankeerberghen et al., 1998). In 2018, higher efficacy of combination corrector/potentiator (VX-661/770, Symkevi®) was demonstrated in these patients carrying the F508del mutation on the second allele (Wainwright et al., 2015). Analyses of rectal biopsies performed in this group demonstrated variable level of CFTR function (1.5–39.7% of wt-CFTR function), which corresponded with severity of clinical symptoms of the disease. We performed the FIS assay to predict possible responsiveness to available treatment molecules in individual patients. In a total of 5 patients, treatment with

Symkevi® has already been initiated. Due to the short duration of treatment, its effect cannot be evaluated yet. These were patients carrying the F508del mutation on the second allele. Treatment with Symkevi® was also initiated in 1 patient carrying mutation other than F508del on the other allele. The result of FIS assay, which indicated possible high clinical benefit, presented supportive argument for initiating this treatment. This is another case of patient carrying two rare CFTR mutations, in which decision to treat with CFTR modulators was based on ex vivo prediction on intestinal organoids (Ramalho et al., 2021). To evaluate the clinical benefit, longer follow up is needed. In last group, 2 patients with ultra-rare CFTR mutations were enrolled. In first patient, we identified a completely new and as yet undescribed CFTR mutation (S955P). With the cut-off values of sweat chloride test, normal values of fecal elastase and mild respiratory symptoms, the diagnosis of CF was inconclusive. Analysis of patient's native tissue showed residual function of the CFTR protein (18% of wt-CFTR), not reaching the value of a healthy individual (more than 30% of wt-CFTR). Analyzes performed on cell cultures (derived from the patient's own tissue and simultaneously de novo generated with S955P-CFTR cDNA) showed, that this was a mutation leading to reduced CFTR channel opening probability with lower stability in the cell membrane. S955P was classified as a functional class III / VI mutation. *Ex vivo* prediction assumed moderate clinical benefit of treatment with combination of corrector and potentiator (VX-809/770 - Orkambi® and VX-661/770 - Symkevi®). In second patient, molecular genetic testing revealed a 1717-2A> G mutation. The clinical phenotype and effect on the patient's tissues have not yet been sufficiently described, and in addition to our patient, this mutation was described in only one case in Romania. (Highsmith et al., 1997) Our patient was diagnosed with CF by newborn screening, with increased sweat chloride concentration, low value of fecal elastase indicative of pancreatic insufficiency and mild respiratory symptoms. Although analysis of rectal biopsy showed residual CFTR protein function (13% wt-CFTR), FIS assay did not indicate potential clinical benefit from treatment with available CFTR modulators.

As a part of our project, measurements in the Ussing chamber were performed. These measurements were included in an international cohort of patients with CF. We compared parameter $I_{sc - 1/F/C}$, used as a gold standard to distinguish healthy individuals from patients with CF, with others, which were extracted directly from the measurement records on rectal biopsies. In this way, we identified a new parameter showing higher degree of correlation with the sweat chloride concentration, FEV1, FVC, BMI and the value of fecal elastase. This parameter ($V_{1/F + 1/F/C}$) corresponds to maximal activation of the CFTR protein and correlates

better with the severity of clinical symptoms of the disease. Therefore, it could be used as a diagnostic tool to distinguish between patients with classic or atypical CF and healthy individuals.

Wide range of CFTR mutations include more or less rare variants. Some of these variants have variable clinical consequences, in some of them the exact mechanism of defective protein formation has not been described so far. Each of these variants affects only a small group of individuals worldwide which makes the prediction of the course of disease more complicated. Moreover, not only the diagnosis of the disease, but also the prediction of possible therapeutic responses to available CFTR modulators might be challenging. A classical clinical study to determine the potential effect of new drugs is not feasible in this patient's group due to their small number. As an alternative to conventional clinical trials, new approaches have emerged in recent years using the cell models derived from patient's own tissue to predict individual *ex vivo* therapeutic response. 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 be the way for getting the best possible combination of treatment molecules for patients carrying more frequent CFTR mutations (such as F508del), but also for patients carrying ultra - rare mutations. Efforts to maximize the understanding of the molecular mechanism responsible for the formation of a defective CFTR protein remain essential. This alternative system could serve as a tool to get the most effective, personalized treatment for the widest possible group of patients with CF, presenting translation of the research into clinical practice.

12. 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] Kunzelmann K, Schreiber R, Hadorn HB. Bicarbonate in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2017;16:653–62. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.06.005>.
- [3] Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* (80-) 1995; 269:847–50. <https://doi.org/10.1126/science.7543698>.
- [4] Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet* 2016;388:2519–31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00576-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00576-6).
- [5] Mitri C, Xu Z, Bardin P, Corvol H, Touqui L, Tabary O. Novel Anti-Inflammatory Approaches for Cystic Fibrosis Lung Disease: Identification of Molecular Targets and Design of Innovative Therapies. *Front Pharmacol* 2020; 11:1096. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01096>.
- [6] Haq IJ, Gray MA, Garnett JP, Ward C, Brodrie M. Airway surface liquid homeostasis in cystic fibrosis: Pathophysiology and therapeutic targets. *Thorax* 2016;71:284–7. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2015-207588>.
- [7] Wilschanski M, Novak I. The cystic fibrosis of exocrine pancreas. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009746>.
- [8] Kamal N, Surana P, Koh C. Liver disease in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Gastroenterol* 2018;34:146–51. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000432>.
- [9] Houwen RH, Van Der Doef HP, Sermet I, Munck A, Hauser B, Walkowiak J, et al. Defining DIOS and constipation in cystic fibrosis with a multicentre study on the incidence, characteristics, and treatment of DIOS. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:38–42. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a6e01d>.
- [10] Andersen Dh. Cystic Fibrosis of the Pancreas and its Relation to Celiac Disease. *Am J Dis Child* 1938;56:344. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1938.01980140114013>.
- [11] Cystic Fibrosis Trust. UK CF Registry 2016: 1–6. <https://www.cysticfibrosis.org.uk/the-work-we-do/uk-cf-registry> (accessed June 10, 2021).
- [12] Cystic Fibrosis Foundation. Patient Registry | CF Foundation. 2018.
- [13] Boeck K De, Amaral MD. Rapid Review Progress in therapies for cystic fi brosis. *Lancet Respir Med* 2016;2006:1–13. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00023-](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00023-)

0.

- [14] Elborn JS, Shale DJ, Britton JR. Cystic fibrosis: Current survival and population estimates to the year 2000. *Thorax* 1991; 46: 881–5. <https://doi.org/10.1136/thx.46.12.881>.
- [15] Johns Hopkins University. OMIM Entry - * 602421 - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; CFTR. *Online Mendelian Inherit Man* 2016. <https://www.omim.org/entry/602421> (accessed August 18, 2021).
- [16] Tsui LC, Dorfman R. The cystic fibrosis gene: A molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009472>.
- [17] Dorwart M, Thibodeau P, Thomas P. Cystic fibrosis: Recent structural insights. *J Cyst Fibros* 2004;3:91–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2004.05.020>.
- [18] Farinha CM, Canato S. From the endoplasmic reticulum to the plasma membrane: mechanisms of CFTR folding and trafficking. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74: 39–55. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2387-7>.
- [19] Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;52:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.004>.
- [20] Bouhamdan Mohamad, Youming Xie, Sun F. Structure-Function Relationships of CFTR in Health and Disease: The Pancreas Story. *Pancreapedia Exocrine Pancreas Knowl Base* 2018:1–21. <https://doi.org/10.3998/panc.2018.15>.
- [21] CFTR2.org | CFTR2 n.d. <https://cftr2.org/> (accessed May 23, 2020).
- [22] 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>.
- [23] European Cystic Fibrosis Society. Annual Reports European Cystic Fibrosis Society 2017:1–149. <https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports> (accessed October 18, 2020).
- [24] Český registr cystické fibrózy 2.0 n.d. <https://cfregistr.cz/registr/statistics/mutations/> (accessed October 18, 2020).
- [25] Veit G, Avramescu RG, Chiang AN, Houck SA, Cai Z, Peters KW, et al. From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations. *Mol Biol Cell* 2016;27:424–33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-04-0935>.
- [26] Welsh M. J, Smith A. E. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993;73:1251–4. <https://doi.org/10.1016/0092->

8674(93)90353-R.

- [27] Bell S. C, De Boeck K, Amaral MD. New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacol Ther* 2015;145:19–34. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.06.005>.
- [28] Cutting GR. Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet* 2015;16:45–56. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>.
- [29] Farrell PM, White TB, Ren CL, 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>.
- [30] Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, 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>.
- [31] Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Sands D, Stremmler N, Vavrova V, Deneuve 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>.
- [32] 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>.
- [33] Sermet-Gaudelus I, Nguyen-Khoa T, Hatton A, Hayes K, Pranke I. Sweat Chloride Testing and Nasal Potential Difference (NPD) Are Primary Outcome Parameters in Treatment with Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Modulators. *J Pers Med* 2021;11:729. <https://doi.org/10.3390/jpm11080729>.
- [34] Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, Deneuve E, Bui S, Huet F, et al. Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax* 2010;65:539–44. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.123422>.
- [35] Farrell PM, Rock MJ, Baker MW. The impact of the CFTR gene discovery on cystic fibrosis diagnosis, counseling, and preventive therapy. *Genes (Basel)* 2020;11:1–15. <https://doi.org/10.3390/genes11040401>.
- [36] Castellani C, Massie J, Sontag M, Southern KW. Newborn screening for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* 2016;4:653–61. <https://doi.org/10.1016/S2213->

2600(16)00053-9.

- [37] Cade A, Walters MP, Mcginley N, Firth J, Brownlee KG, Conway SP, et al. Evaluation of Fecal Pancreatic Elastase-1 as a Measure of Pancreatic Exocrine Function in Children With Cystic Fibrosis. vol. 29. 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0496\(200003\)29:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0496(200003)29:3).
- [38] Daftary A, Acton J, Heubi J, Amin R. Fecal elastase-1: Utility in pancreatic function in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2006;5:71–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2006.01.005>.
- [39] Kerem BS, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* (80-) 1989;245:1073–80. <https://doi.org/10.1126/science.2570460>.
- [40] 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>.
- [41] Rowe SM, Daines C, Ringshausen FC, 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>.
- [42] Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, 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>.
- [43] Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, Horsley A, Mall MA, McKone EF, 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>.
- [44] Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, Lands LC, McKone EF, 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>.
- [45] Kalydeco | European Medicines Agency n.d. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kalydeco> (accessed August 3, 2021).
- [46] Orkambi | European Medicines Agency n.d. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orkambi> (accessed August 3, 2021).
- [47] Symkevi | European Medicines Agency n.d. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/symkevi> (accessed August

- 3, 2021).
- [48] Kaftrio | European Medicines Agency n.d. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kaftrio> (accessed August 3, 2021).
- [49] Amaral MD, de Boeck K, Amaral M, Davies JC, 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>.
- [50] Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, Solomon GM, VanDevanter DR, Boyle MP, 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>.
- [51] 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>.
- [52] Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, 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>.
- [53] Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, Ramalho AS, Bonadia LC, 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>.
- [54] Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, Vonk A, Jonge HR De, Janssens HM, 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>.
- [55] Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 2016;165:1586–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.
- [56] 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>.
- [57] Zomer-van Ommen DD, de Poel E, Kruisselbrink E, Oppelaar H, Vonk AM, Janssens HM, et al. Comparison of ex vivo and in vitro intestinal cystic fibrosis models to

- measure CFTR-dependent ion channel activity. *J Cyst Fibros* 2018;17:316–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.02.007>.
- [58] Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot KM, 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>.
- [59] Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruisselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, et al. Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis. *Cell Rep* 2019;26:1701-1708.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.068>.
- [60] Wang XR ober., Li C. Decoding F508del misfolding in cystic fibrosis. *Biomolecules* 2014;4:498–509. <https://doi.org/10.3390/biom4020498>.
- [61] Knowles MR. New findings from the international CF gene modifier consortium. *Pediatr Pulmonol* 2015;50:171–2.
- [62] Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, Van Braeckel E, Rowe SM, Tullis E, et al. Efficacy and safety of the elexacaftor plus tezacaftor plus ivacaftor combination regimen in people with cystic fibrosis homozygous for the F508del mutation: a double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet* 2019;394:1940–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32597-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32597-8).
- [63] Furstova E, Dousova T, Beranek J, Libik M, Fila L, Modrak M, et al. Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.07.006>.
- [64] Vankeerberghen A, Wei L, Teng H, Jaspers M, Cassiman JJ, Nilius B, et al. Characterization of mutations located in exon 18 of the CFTR gene. *FEBS Lett* 1998;437:1–4. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01042-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01042-4).
- [65] Burgel PR, Fajac I, Hubert D, Grenet D, Stremmler N, Roussey M, et al. Non-classic cystic fibrosis associated with D1152H CFTR mutation. *Clin Genet* 2010;77:355–64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01294.x>.
- [66] Terlizzi V, Carnovale V, Castaldo G, Castellani C, Cirilli N, Colombo C, et al. Clinical expression of patients with the D1152H CFTR mutation. *J Cyst Fibros* 2015;14:447–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.12.012>.
- [67] Durmowicz AG, Lim R, Rogers H, Rosebraugh CJ, Chowdhury BA. 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>.
- [68] DeStefano S, Gees M, Hwang TC. Physiological and pharmacological

- characterization of the N1303K mutant CFTR. *J Cyst Fibros* 2018;17:573–81. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.05.011>.
- [69] Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Boat TE, Spock A, et al. A Novel Mutation in the Cystic Fibrosis Gene in Patients with Pulmonary Disease but Normal Sweat Chloride Concentrations. *N Engl J Med* 1994;331:974–80. <https://doi.org/10.1056/nejm199410133311503>.
- [70] Chiba-Falek O, Parad RB, Kerem E, Kerem B. Variable levels of normal RNA in different fetal organs carrying a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splicing mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1998–2002. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.6.9808012>.
- [71] Gilbert F, Li Z, Arzimanoglou I, Bialer M, Denning C, Gorvoy J, et al. Clinical spectrum in homozygotes and compound heterozygotes inheriting cystic fibrosis mutation 3849+10kbC>T: Significance for geneticists. *Am J Med Genet* 1995;58:356–9. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320580411>.
- [72] Dörk T, Macek M, Mekus F, Tümmler B, Tzountzouris J, Casals T, et al. Characterization of a novel 21-kb deletion, CFTRdele2,3(21 kb), in the CFTR gene: A cystic fibrosis mutation of Slavic origin common in Central and East Europe. *Hum Genet* 2000;106:259–68. <https://doi.org/10.1007/s004390000246>.
- [73] Castellani C, Cuppens H, Macek M, Cassiman JJ, Kerem E, Durie P, et al. Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros* 2008;7:179–96. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2008.03.009>.
- [74] Hull J, Shackleton S, Harris A. Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:689–92. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.6.689>.
- [75] Witt M, Pogorzelski A, Zebrak J, Rutkiewicz E. A cystic fibrosis patient homozygous for 621 + 1G → T mutation has a severe pulmonary disease, mild pancreatic insufficiency and a gastro-esophageal reflux. *Clin Genet* 1996;50:149–51. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1996.tb02370.x>.
- [76] Highsmith WE, Burch LH, Zhou Z, Olsen JC, Strong T V., Smith T, et al. Identification of a splice site mutation (2789 + 5 G>A) associated with small amounts of normal CFTR mRNA and mild cystic fibrosis. *Hum Mutat* 1997;9:332–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1997\)9:4<332::AID-HUMU5>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:4<332::AID-HUMU5>3.0.CO;2-7).
- [77] Hwang TC, Yeh JT, Zhang J, Yu YC, Yeh HI, Destefano S. Structural mechanisms of CFTR function and dysfunction. *J Gen Physiol* 2018;150:539–70.

- <https://doi.org/10.1085/jgp.201711946>.
- [78] 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>.
- [79] Haardt M, Benharouga M, Lechardeur D, Kartner N, Lukacs GL. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* 1999; 274: 21873–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.21873>.
- [80] Sharma N, Sosnay PR, Ramalho AS, Douville C, Franca A, Gottschalk LB, et al. Experimental Assessment of Splicing Variants Using Expression Minigenes and Comparison with In Silico Predictions. *Hum Mutat* 2014; 35: 1249–59. <https://doi.org/10.1002/humu.22624>.
- [81] Popa I, Pop L, Popa Z, Schwarz MJ, Hambleton G, Malone GM, et al. Cystic fibrosis mutations in Romania. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 212–3. <https://doi.org/10.1007/s004310050586>.
- [82] Mall M, Wissner A, Seydewitz HH, Kuehr J, Brandis M, Greger R, et al. Defective cholinergic Cl⁻ secretion and detection of K⁺ secretion in rectal biopsies from cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Liver Physiol* 2000;278:G617–24. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2000.278.4.G617>.
- [83] 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>.
- [84] Vecchio-Pagán B, Blackman SM, Lee M, Atalar M, Pellicore MJ, Pace RG, 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>.
- [85] Ramalho AS, Förstová E, Vonk AM, 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>.

13. PŘÍLOHA Č. 1 – SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace, které jsou podkladem dizertace

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. **IF 4,352**

* both authors contributed equally to this work

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. **IF 3,367**

Furstova E, **Dousova T**, Beranek J, Libik M, Fila L, Modrak M, Cinek O, Macek M Jr, Drevinek P. *Response to elxacaftor/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**

Publikace 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 MC, Pankonien I, Clarke LA, Sousa LS, Silva IAL, Railean V, **Doušová T**, Fuxe J, Amaral MD. 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