

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Modely *ex vivo* vedoucí k personalizaci diagnostického a terapeutického přístupu u pacientů s cystickou fibrózou

*Ex vivo* models leading to personalized diagnostic and therapeutic approach in patient with cystic fibrosis

**Eva Fürstová**

Praha, 2024



Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu v biomedicině na Pediatrické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN Motol.

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

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Fyziologie a patofyziologie člověka dne 26.9.2024 v Praze od ..... hod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:  
prof. MUDr. Otomar Kittnar, MBA, CSc.

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

Tato práce vznikla za podpory grantů:

GA UK, č. 1034819; AZV ČR, č. NU20-07-0 0 049; AZV ČR, č. NU23-07-00079

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

## ABSTRAKT

### Modely ex vivo vedoucí k personalizaci diagnostického a terapeutického přístupu u pacientů s cystickou fibrózou

Cystická fibróza (CF) je dědičné onemocnění způsobené bialelickou mutací *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) genu, která má za následek defektní CFTR protein fungující jako chloridový iontový kanál. Klinické projevy jsou způsobené abnormálním přesunem iontů chlóru a vody přes epiteliální membrány. Mezi dominantní příznaky patří progresivní plicní onemocnění a pankreatická insuficience. Léčba CF byla donedávna pouze symptomatická: dechová rehabilitace, substituce trávicích enzymů a vitamínů a včasná a intenzivní léčba respiračních infekcí. Od roku 2012 získávají na významu léky cílicí přímo na defektní protein CFTR na buněčné úrovni, tzv. CFTR modulátory. CFTR modulátory jsou indikovány na základě specifického genotypu pacienta, ale nejsou dostupné pro pacienty se vzácnými mutacemi z důvodu nemožnosti provést klinické hodnocení na malém počtu pacientů, byť někteří by mohli z léčby modulátory profitovat. Jednou z metod, jak tuto výzvu překonat, je využití *ex vivo* modelů, které umožňují preklinické testování léčebné odpovědi *in vitro*. Tato disertační práce se zaměřuje na využití buněčného modelu střevních organoidů získaných od CF pacientů k predikci individuální odpovědi na CFTR modulátory pomocí metody forskolinem indukovaného bobtnání organoidů u vybraných skupin pacientů; dále se zaměřuje na rozdíly morfologie střevních organoidů u CF pacientů a zdravých kontrol a využití těchto rozdílů v diagnostice CF. Naše práce ukazuje, že střevní organoidy jsou užitečným *in vitro* modelem pro výzkum CF. Zdůrazňuje nutnost vývoje prediktivních nástrojů k hodnocení individuální léčebné odpovědi na CFTR modulátory s cílem personalizace léčby, zejména u pacientů se vzácným genotypem.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Cystická fibróza, tkáňové modely, střevní organoidy, CFTR modulátory, personalizovaná medicína

## **ABSTRACT**

### *Ex vivo models leading to personalised diagnostic and therapeutic approach in patients with cystic fibrosis*

Cystic fibrosis (CF) is a hereditary disease caused by a biallelic mutation of the *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gene, resulting in a defective CFTR protein functioning as a chloride ion channel. Clinical manifestations are caused by abnormal transport of chloride ions and water across epithelial membranes. The predominant symptoms include progressive lung disease and pancreatic insufficiency. The treatment of CF is mainly symptomatic: respiratory physiotherapy, substitution of digestive enzymes and vitamins, and early and intensive treatment of respiratory infections. Since 2012, new drugs known as CFTR modulators have gained importance. CFTR modulators target the defective CFTR protein at the cellular level; the treatment is indicated based on the patient's specific *CFTR* genotype; however, it's not available for all patients, especially ones with rare *CFTR* mutations due to the inability to conduct clinical trials with a small number of patients, even though some might benefit from modulator treatment. One method to overcome this challenge is using *ex vivo* models, which allow preclinical testing of treatment responses *in vitro*. This dissertation focuses on the use of patient-derived intestinal organoids to predict individual treatment responses to CFTR modulators using the forskolin-induced swelling assay in selected patients; moreover, it focuses on differences in the morphology of intestinal organoids in CF patients and healthy controls and using these differences in CF diagnostics. Our work shows that intestinal organoids are a useful *in vitro* model for CF research. It highlights the need for developing predictive tools to evaluate individual treatment responses to CFTR modulators to personalise treatment, especially for patients with rare genotypes.

**KEYWORDS:** Cystic fibrosis, tissue models, intestinal organoids, CFTR modulators, personalised medicine

## **Obsah**

Úvod do problematiky .....	7
Hypotéza .....	13
Cíle práce .....	13
Metodika .....	14
Výsledky .....	18
Diskuze .....	20
Závěr .....	21
Shrnutí .....	23
Summary .....	24
Literatura.....	26
Přehled publikační činnosti.....	32
<i>Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace. ....</i>	<i>32</i>

## Úvod do problematiky

Cystická fibróza (CF) je nejčastější život limitující monogenní onemocnění zejména exokrinních žláz a sekreторického epitelu, je způsobená mutací v *CFTR* genu (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) kódujícím epitelový iontový kanál, který umožňuje transport aniontů chloru a bikarbonátu (Riordan, 2008; Shamsuddin & Quinton, 2014). Absence nebo dysfunkce CFTR sekundárně vede k abnormálnímu paracelulárnímu transportu vody v důsledku narušeného iontového koncentračního gradientu. Důsledkem je přítomnost viskózního hlenu v dýchacích cestách, zhuštěné žluče ve žlučových cestách a zahuštěného sekretu v pankreatických vývodech, vedoucí k multiorganovým patologiím. Život limitující je zejména progresivní plicní onemocnění, které vzniká na podkladě obstrukce dýchacích cest hlenem, doprovázené opakovanými až chronickými respiračními infekcemi a chronickým zánětem (de Boeck & Amaral, 2016).

### Diagnostika

Diagnóza CF jako autosomálně recesivního onemocnění je závislá na **přítomnosti dvou *CFTR* mutací**, klasifikovaných jako patogenní („disease-causing mutations“), které jsou definované v databázi CFTR2 (Farrell *et al.* 2017; CFTR2 database), a dále na **abnormální hodnotě chloridů v potu** (nad 60 mmol/l). V České republice se od roku 2009 na včasné diagnostice významně podílí novorozenecký screening. Nicméně stále existují situace, ve kterých není diagnóza jednoznačná, např. novorozenci s pozitivním screeningem, ale pouze se středně zvýšenými chloridy v potu (30–60 mmol/l) a jen jednou nebo žádnou patogenní *CFTR* variantou, nebo variantou s nejasným významem. V ČR se v registru pacientů sleduje 54 JEDINCŮ s pozitivním novorozeneckým screeningem a neuzavřenou diagnózou, tzv. CF-SPID (cystic fibrosis – screening positive, inconclusive diagnosis). Z toho vyplývá, že u 7 % jedinců v ČR nemáme zcela uzavřenou diagnostiku. Další funkční vyšetření CFTR proteinu není rutinně

k dispozici v klinické praxi a chybí diagnostické nástroje, které by pomohly jednoznačně rozhodnout o diagnóze.

### Funkční klasifikace CFTR mutací

Klinický obraz je u CF pacientů velmi variabilní co do závažnosti průběhu, komplikací onemocnění a délky přežití. Fenotyp onemocnění je asociován zejména s *CFTR* genotypem. Je popsáno více než 2000 *CFTR* mutací (Cystic Fibrosis Mutation Database, online), ze kterých cca 720 bylo charakterizováno v databázi CFTR2 jako mutace, které způsobují onemocnění (disease causing) (CFTR2 database, online). Na základě intracelulárního zpracování a funkce CFTR kanálu byly mutace rámcově rozděleny do 7 funkčních tříd (de Boeck & Amaral, 2016): **Třída I** obsahuje nonsense mutace a mutace tvořící předčasný stop kodon, které mají často za následek degradaci mRNA nebo předčasné ukončení translace mRNA (Wilschanski, 2012). **Třída II** obsahuje mutace způsobující defektní transport chybně složeného CFTR proteinu (sem řadíme nejčastější mutaci F508del). **Třída III** je charakterizována defektem v otevírání CFTR kanálu na membráně (tzv. gating mutace). **Třída IV** způsobuje snížené proudění iontů přes CFTR kanál. **Třída V** vede k redukci počtu normálního CFTR proteinu. **Třída VI** destabilizuje CFTR kanál v plazmatické membráně a dochází rychleji k endocytóze, anebo zpomalení recyklace. **Třída VII** jsou mutace obsahující významné delece části *CFTR* genu a netvoří se žádná mRNA. Navzdory definované klasifikaci mutací do funkčních tříd je známo, že jednotlivé mutace mohou ovlivnit funkci CFTR na několika úrovních. Například u F508del, nejčastější mutaci třídy II, je narušené složení proteinu a jeho transport k plazmatické membráně, ale také vykazuje defekt otevírání chloridového kanálu charakteristický pro mutace třídy III, stejně jako sníženou stabilitu na plazmatické membráně typickou pro mutace třídy VI (Veit *et al.*, 2016). Tato zjištění mohou částečně vysvětlit *in vitro* rozdíly v léčebné odpovědi na specifické léky cílící na defektní CFTR protein v buňce a / nebo na membráně, tzv. CFTR modulátory,



mezi různými mutacemi ve stejné třídě (Veit *et al.*, 2016). Nicméně pro některé vzácné *CFTR* mutace zůstává molekulární a funkční deficit neznámý (Sosnay *et al.*, 2013). Současný výzkum se snaží tyto mutace funkčně i klinicky charakterizovat, a z tohoto důvodu byl zaveden koncept tzv. theratypingu (volně přeloženo jako typizace terapie), kde jsou neklasifikované *CFTR* mutace zařazeny do „theratypu“ na základě jejich dopadu na množství a *in vitro* měřenou funkci *CFTR* kanálu a reakci na *CFTR* modulátory (nezávisle na funkční třídě mutace) (Clancy *et al.*, 2019).

### Léčba

Základ léčby CF je symptomatická terapie: ke zpomalení progresivního plicního postižení je nutná intenzivní dechová rehabilitace, inhalace mukoaktivních látek (hypertonického solného roztoku, mukolytik), inhalační antibiotika, dle potřeby častější užívání systémových antibiotik a protizánětlivé léky. Ke zvládnutí gastrointestinálních symptomů je nutné zejména substituovat trávicí enzymy, vitamíny rozpustné v tucích a navýšit kalorický příjem.

Poměrně nově se v léčbě využívají **CFTR modulátory**, malé molekuly, které cílí na defektní *CFTR* protein na buněčné úrovni a jejich cílem je obnovení funkce defektního *CFTR* proteinu. Dosud pouze dvě skupiny modulátorů uspěly v klinickém testování a byly schváleny k použití u pacientů: I) **potenciátory** a II) **korektory**, navíc pro většinu pacientů je k obnově funkce *CFTR* nutné tyto dvě kategorie modulátorů zkombinovat. I) **potenciátory** obnovují funkčnost chloridového kanálu, který je již přítomen na buněčné membráně, II) **korektory** opravují maturaci a transport *CFTR* proteinu z cytoplasmy k plasmatické membráně.

V roce 2012 byl schválen potenciátor **ivakaftor** (VX-770; Vertex Pharmaceuticals) pro léčbu pacientů s *CFTR* mutací funkční třídy III a mutací G551D (tzv. keltská mutace), který má cca 3-5 % populace CF pacientů. Ivakaftor má pravděpodobně vliv na stabilitu *CFTR* a umožňuje proteinu být dostatečně

flexibilní, aby mohlo probíhat otevírání a zavírání kanálu, tzv. gating cykly, tím potencuje funkci CFTR proteinu (Cholon *et al.*, 2014). **Korektory** pozitivně ovlivňují defektní intracelulární transport na buněčnou membránu chybně složeného CFTR proteinu. V současnosti se korektory dělí na **korektory typu I**, stabilizují alosterickou konfiguraci CFTR, umožní správné složení CFTR a jeho transport na membránu (Fiedorczuk & Chen, 2022). Korektory typu II nemáme k dispozici v klinické praxi. **Korektory typu III** mění alosterickou konformaci nukleotid vázající domény a transmembránové domény CFTR proteinu (Veit *et al.*, 2020; Ferreira, Buarque & Lopes-Pacheco, 2024). Důležité je, že se liší vazebné místo pro korektory I. a III. typu, efekt na korekci transportu je aditivní.

První CFTR korektor, který uspěl v klinickém testování, byl **lumakaftor** (VX-809, Vertex Pharmaceuticals), korektor I. typu, a v kombinaci s ivakaftorem byl schválen pro léčbu pacientů s nejčastějším genotypem F508del/F508del v roce 2015 (indikován pro cca 40 % populace CF pacientů) (Wainwright *et al.*, 2015). Další korektor **tezakaftor** (VX-661, Vertex Pharmaceuticals), korektor I. typu, byl schválen v kombinaci s ivakaftorem v roce 2018 pro pacienty s genotypem F508del/F508del (Rowe *et al.*, 2017) a pro pacienty s mutacemi s reziduální funkcí CFTR proteinu (méně než 5 % celkové populace CF pacientů). Nejnovější korektor **elexakaftor** (VX-445, Vertex Pharmaceuticals), korektor III. Typu. se stal součástí dosud nejefektivnější kombinace CFTR modulátorů elexakaftor/tezakaftor/ivakaftor (ETI) schválené Evropskou lékovou agenturou v roce 2020 pro pacienty, kteří mají alespoň jednu mutaci F508del (Middleton *et al.*, 2019), tj. pro téměř 85-90 % všech pacientů.

Přestože modulátorové léky představují převratný úspěch v léčbě CF, je zde celá řada nezodpovězených otázek. Léčba CFTR modulátory není dostupná všem. Z principu charakteristiky funkčních tříd nebudou CFTR modulátory efektivní u pacientů s I. nebo VII. funkční třídou, u těchto pacientů není v buňce přítomný protein, který by mohl být korigován/potencován. Existují pacienti se vzácnými mutacemi, kteří s ohledem na nízkou frekvenci výskytu mutace v populaci nejsou

zařazení do standardního klinického testování, ale potenciálně by mohli z CFTR modulující léčby profitovat (Sosnay *et al.*, 2013; McCague *et al.*, 2019). Přestože CFTR genotyp je určující pro indikaci CFTR modulátorů, z předchozích studií víme, že více než 50 % klinické variability se základním genotypem nespojuje (Cutting, 2015), což ukazují i individuální rozdíly v odpovědi na léčbu pozorované v klinických studiích (Wainwright *et al.*, 2015; Middleton *et al.*, 2019; Heijerman *et al.*, 2019; Taylor-Cousar *et al.*, 2017), a také při *in vitro* vyšetřeních (Ramalho *et al.*, 2021).

K heterogenitě klinického průběhu, tj. fenotypu, přispívá několik faktorů: enviromentální a genetické. Enviromentální faktory mohou mít vliv například až na 50 % variabilitu plicních funkcí u pacientu s CF (Collaco *et al.*, 2010). Nicméně nutno podotknout, že i pacienti se stejným genotypem, vyrůstajícími ve stejném prostředí (sourozenci), mohou mít velmi variabilní klinický průběh (Vanscoy *et al.*, 2007), který není vysvětlitelný ani CFTR genotypem a je pouze částečně vysvětlitelný enviromentálními faktory. Na variabilitě klinického průběhu se mohou podílet další genetické varianty mimo CFTR, tzv. geny modifikující onemocnění (Paranjapye *et al.*, 2020; Cutting, 2010).

### Buněčné modely CF

S ohledem na fakt, že léčba CFTR modulátory není dostupná pro pacienty se vzácnými CFTR mutacemi, se nabízí použití patientských buněčných modelů, které umožní preklinické terapeutické testování CFTR modulátorů *in vitro*.

Jeden z využívaných buněčných modelů jsou intestinální organoidy. Organoidy jsou 3D kultury vytvořené ze zárodečných buněk přítomných v Lieberkühnových kryptách střevního epitelu. Během kultivace za specifických podmínek se zárodečné buňky v extracelulární matrix (Matrigel, Corning, USA) samy organizují do sférických struktur s centrálním lumen, tzv. organoidů. Organoidy jsou tvořené jednou vrstvou přesně polarizovaných epitelových buněk, kde

apikální membrána směřuje do centra (lumen) organoidu (Sato & Clevers, 2013). U zdravého jedince je na povrchu apikální membrány vysoce exprimovaný funkční CFTR protein, u pacienta s CF kopíruje CFTR protein funkční defekt dle genotypu pacienta. Střevní organoidy se získávají jednoduchou a nebolestivou rektální biopsií. Střevní buňky mají významně lepší biologické vlastnosti než buňky respiračního epitelu, a jejich kultivace je snadnější. Z tohoto důvodu se jedná o široce využívaný *ex vivo* buněčný model k analýze funkce CFTR proteinu a individuální terapeutické odpovědi na CFTR modulátory.

Intestinální organoidy je možné kultivovat téměř nekonečně dlouho při použití specifických růstových faktorů (Sato & Clevers, 2013; Sato *et al.*, 2011). Tkáňová kultura organoidů je geneticky stabilní během dlouhodobé kultivace (Sato & Clevers, 2013), udržuje si epigenetické otisky definované lokálně specifickými faktory *in vivo* (Middendorp *et al.*, 2014). Organoidy mohou být uloženy do biobanky zamražením v tekutém dusíku a je možné je znovu analyzovat v dlouhodobých studiích nebo s potenciálně novými CFTR modulátory ve vývoji (Van De Wetering *et al.*, 2015).

### Funkční vyšetření intestinálních organoidů

Organoidový model se využívá ke zhodnocení funkce CFTR kanálu pomocí metody forskolinem indukované bobtnání (forskolin induced swelling assay, FIS). Forskolin *in vitro* stimuluje adenylát cyklázu a tím zvyšuje hladinu cAMP v buňce, ten jako druhý posel aktivuje proteinkinázu, která fosforyluje ATP přítomné na nukleotid-vázající doméně CFTR kanálu, tím kanál aktivuje (Dekkers *et al.*, 2013) a způsobí rychlou sekreci iontů do lumen organoidu, které osmoticky následuje voda. Tento proces je u intestinálních organoidů striktně vázaný na CFTR kanál. Pokud inkubujeme patientské organoidy s CFTR modulátory, můžeme pozorovat záchranu funkce CFTR kanálu. Přestupem iontů a vody do lumen organoidu za stimulace forskolinem a CFTR modulátory se zvětšuje objem vlastního organoidu a je pozorováno bobtnání („swelling“), které

můžeme kvantifikovat pomocí obrazové analýzy a fluorescenčního konfokálního mikroskopu s videozáznamem. Následně se ze změny obsahu organoidu vypočítá aktivita CFTR kanálu.

Otázkou zůstává, zda pomocí *in vitro* vyšetření lze predikovat klinickou odpověď na CFTR modulátory. Korelační studie jsou dostupné pouze na malém vzorku pacientů s heterogenním *CFTR* genotypem (Dekkers *et al.*, 2016). Navíc autoři ukázali, že FIS odpovědi jsou variabilní mezi pacienty se stejným *CFTR* genotypem a výsledky naznačují, že odpověď na CFTR modulátory jsou ovlivněné jak základním *CFTR* genotypem, tak individuálním genetickým pozadím každého pacienta.

## Hypotéza

FIS vyšetření intestinálních organoidů lze využít k predikci *in vivo* terapeutického efektu CFTR modulátorů, a dokonce může vést ke stratifikaci míry léčebné odpovědi. Genetické pozadí mimo vlastní *CFTR* genotyp může ovlivňovat léčebnou odpověď na CFTR modulátory. Morfologie střevních organoidů se na první pohled liší mezi zdravými jedinci a pacienty s CF, tohoto fenoménu lze využít v diagnostice onemocnění.

## Cíle práce

- (1) Stratifikace *in vitro* léčebné odpovědi na jednotlivé CFTR modulátory u vybraných skupin pacientů pomocí intestinálních organoidů a FIS vyšetření.
- (2) Korelace *in vitro* měřené odpovědi na CFTR modulátory s *in vivo* klinickými parametry u pacientů na léčbě.
- (3) Zhodnocení využití intestinálních organoidů jako prediktivního modelu terapeutické odpovědi na CFTR modulátory a jejich využití v personalizované medicíně.

- (4) Analýza genetického pozadí pomocí sekvenace *CFTR* genu a zhodnocení vlivu potenciálních nových variant na *in vitro* nebo *in vivo* terapeutickou odpověď na *CFTR* modulátory.
- (5) Analýza morfologie střevních organoidů a jejich potenciální využití v diagnostice CF.

## **Metodika**

### Výběr pacientů

Do studií byli zařazeni pacienti s cystickou fibrózou s různým *CFTR* genotypem sledovaní v Centrech cystické fibrózy na Pediatrické klinice 2. LF UK a FN Motol, Pneumologické klinice 2. LF UK a FN Motol a v University Hospital Leuven v Belgii. Studie hodnocení morfologie organoidů byla provedena v belgické kohortě pacientů a byly zařazeny i zdravé kontroly. Všechny projekty byly schváleny etickou komisí příslušné organizace (FN Motol, University Hospital Leuven).

### Odběry a kultivace intestinálních organoidů

Odběry vzorků rektální sliznice byly provedeny pomocí sukčního odběrového zařízení, od každého pacienty byly získány 2-3 vzorky rektální sliznice o velikosti cca 2 x 3 mm. Po omytí byly biopsie inkubovány s 0,5 M EDTA, mechanicky rozmělněny a centrifugací izolovány střevní krypty. Krypty byly nasazeny do extracelulární matrix (Matrigel, Corning, USA) ve 24-jamkových destičkách a přelity kultivačním médiem. Kmenové buňky přítomné na dně střevních krypt se za přítomnosti specifických růstových faktorů a inhibitorů kultivačního média samy formují do 3D struktur s centrálním lumen – intestinálních organoidů. Médium bylo vyměňováno 3x týdně a organoidy byly pasážovány každých 7-10 dní. Dle množství materiálu byly po 1. až 3. pasáži organoidy zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy do biobanky. Narostlé organoidy byly připravené

k provedení dalších experimentů za 4 až 6 týdnů kultivace (Dekkers *et al.*, 2013; Vonk *et al.*, 2020).

#### *Forskolinem indukované bobtnání (forskolin induced swelling assay, FIS)*

Narostlé organoidy byly mechanicky rozděleny, nasazeny do 96-jamkové destičky a následně 20-24 hodin inkubovány v různých podmínkách: Na pracovišti KU Leuven byly organoidy inkubovány: (1) za přítomnosti pouze kultivačního média (kontrolní jamky), (2) v médiu obsahující korektor tezakaftor (3  $\mu$ M, Selleckchem, USA), (3) v médiu obsahující korektor lumakaftor (3  $\mu$ M, Selleckchem, USA). Na našem pracovišti byly organoidy inkubovány: (1) za přítomnosti pouze kultivačního média (kontrolní jamky), (2) v médiu obsahující korektor tezakaftor (3  $\mu$ M), (3) v médiu obsahující korektory elexakaftor (2  $\mu$ M, Selleckchem, USA) a tezakaftor (3  $\mu$ M). Pro každou podmínku byly použity dvě jamky, každá obsahující cca 20-60 organoidů. Po inkubaci byly organoidy nabarveny kalceinovou zelení (Invitrogen, USA). Ke stimulaci vlastního CFTR byl k organoidům přidán roztok se vzestupnou koncentrací forskolinu (0,008 – 5,0  $\mu$ M, Selleckchem, USA) a ivakaftor (3  $\mu$ M, Selleckchem, USA), bezprostředně poté byly organoidy analyzovány po dobu 60 minut. Monitorovali jsme velikost organoidů na začátku experimentu ( $t_0$ ) a dále změnu velikosti každých 10 minut po dobu 1 hodiny pomocí obrazové dokumentace konfokálním fluorescenčním mikroskopem s videozáznamem. U jednoho pacienta byly provedeny tři nezávislé experimenty v různých dnech. Získané obrázky byly analyzovány zobrazovacím softwarem Cellprofiler nebo ZEN Microscopy Software: byla vypočítána celková plocha (obsah) organoidů každého obrázku a normalizována na oblast  $t_0$  (přičemž oblast  $t_0$  je považována za bazální hodnotu, tj. 100 %), normalizovaná oblast byla vynesena proti času a vypočteno AUC (area under the curve, plocha pod křivkou) pro každou z jamek. U všech experimentů byl vypočítán průměr AUC dvou jamek pro každou z koncentrací forskolinu a použitých CFTR modulátorů, a konečná vypočtená AUC je průměr ze třech nezávislých experimentů (Dekkers *et al.*, 2013; Vonk *et al.*, 2020).

### Sběr klinických dat a korelace in vitro a in vivo dat

Klinická data byla získána z lékařské dokumentace pacientů s CF, kteří byli léčeni CFTR modulátorem ETI po dobu alespoň 12 měsíců. Pacienti po nasazení ETI byli sledováni v pravidelných intervalech: v čase zahájení léčby a dále po 1, 3, 6, 9 a 12 měsících léčby. Byly monitorovány plicní funkce (FEV1), nutriční stav (BMI). Dále byla sledována koncentrace chloridů v potu před zahájením léčby a 6 měsíců na léčbě, celkový počet dnů na antibioticích 12 měsíců před léčbou a během prvních 12 měsíců terapie. Děti podstoupily psychologické vyšetření a hodnocení kvality života (dotazník CFQ-R, Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised). Získaná klinická data byla korelována s výsledky FIS (parametrem AUC při koncentraci 0,128  $\mu$ M forskolinu).

### Genetická analýza

Ve spolupráci s Ústavem biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol byla u českých pacientů provedena sekvenace celého *CFTR* genu ke konfirmaci základního genotypu a hledání dalších intragenních variant. Byla provedena kompletní analýza genu *CFTR*, včetně analýzy variací počtu kopií uvnitř *CFTR* a pěti intronových sekvencí použitých pro cílené obohacení lokusu *CFTR* v testu Devyser *CFTR* NGS (Deyser.com; Švédsko). Detekované varianty byly ověřeny cíleným Sangerovým sekvenováním DNA. Pomocí MPLA (Multiplex ligation-dependent probe amplification assay) jsme analyzovali intra-*CFTR* přeuspořádání, která by nebyla detekovatelná sekvenačním přístupem, včetně variace počtu kopií s následnou analýzou dat na softwaru Coffalyser.Net. Bioinformatická analýza detekovaných *CFTR* variant byla provedena pomocí platformy SOPHiA DDM (SOPHiA GENETICS; Švýcarsko). Další bioinformatické analýzy byly provedeny pomocí platform VarAFT, FRANKLIN (Genoox.com; Izrael) a Varsome (<https://varsome.com/>) za účelem využití různých algoritmů a stanovení konečného skóre patogenity detekovaných variant. V případě potřeby byl variantní patogenní potenciál ověřen v databázích *CFTR2* a *CFTR* France.



### Hodnocení morfologie střevních organoidů

K hodnocení morfologie se využívají střevní organoidy pěstované dle standardního protokolu. Narostlé byly organoidy nasazeny do 96-jamkových destiček obdobně, jako během přípravy FIS. Organoidy byly hodnoceny nativně pouze za přítomnosti kultivačního média a obarvené kalceinovou zelení. Bylo provedeno hodnocení a srovnání morfologie střevních organoidů CF pacientů a zdravých kontrol pomocí obrazové analýzy (software NIS-Elements AR Analysis), ze které byly vypočítány dva indexy: (1) IR (intensity ratio, poměr intenzity), který kvantifikuje intenzitu fluorescenčního barvení na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti centrálního lumen; (2) CI (circularity index, index kulatosti), který kvantifikuje oválnost organoidů. K rozlišení mezi pacienty s CF a zdravými kontrolami byla použita diskriminační analýza pomocí IR a CI.

### Statistická analýza

Statistickou analýzu u každé z publikací prováděl zkušený statistik, podrobněji viz jednotlivé publikace.

## Výsledky

1) Popsali jsme *in vitro* odpovědi na několik CFTR modulátorů u relativně rozsáhlé belgické skupiny 97 pacientů s 28 různými CFTR genotypy. FIS odpověď na lumacaftor/ivacaftor byla velmi variabilní mezi pacienty se stejným genotypem F508del/F508del.

Záchrana funkce CFTR pomocí CFTR modulátorů korelovala s klinickým zlepšením popsaným v klinických studiích u pacientů s odpovídajícím genotypem: se zlepšením plicních funkcí (vzestup FEV1) a s poklesem chloridů v potů. Reziduální funkce CFTR kanálu korelovala s hodnotami potního testu.

Vyšetřovali jsme několik vzácných CFTR variant (E92K, Q237E, R334W a L159S), u kterých jsme nově prokázali *in vitro* efektivitu CFTR modulátorů.

Dva pacienti se vzácným genotypem získali léčbu na základě našich *in vitro* vyšetření. Pacient s genotypem Q359K\_T360K/Q359K\_T360K byl nasazen na lumkaftor/ivacaftor, pacient s genotypem E60K/I507del byl nasazen na tezakaftor/ivacaftor. U obou pacientů došlo k signifikantnímu klinickému zlepšení. **Publikováno v Ramalho *et al.*, 2021.**

2) Jako první jsme publikovali *in vitro* srovnání nejnovějšího CFTR modulátoru, kombinujícího elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) s lékem předchozí generace tezacaftor/ivacaftor pomocí střevních organoidů a FIS experimentu u 17 pacientů se totožným CFTR genotypem F508del/F508del. Prokázali jsme signifikantně lepší *in vitro* výsledky ETI ve srovnání s tezacaftorem/ivacaftorem. Pozorovali jsme značnou variabilitu v *in vitro* odpovědi mezi jednotlivými pacienty.

U všech pacientů byla provedena sekvenace CFTR genu s cílem identifikovat potenciální nové varianty, které by mohly vysvětlovat variabilitu v *in vitro* odpovědi. Jediný pacient (58-CF) vykazoval srovnatelnou odpověď na oba CFTR modulátory a u tohoto pacienta byla nad rámec F508del nalezeno několik nových CFTR variant, z nichž jedna byla hodnocena jako varianta nejasného významu. **Publikováno ve Furstova *et al.*, 2021.**

3) V další studii jsme rozšířili kohortu pacientů s genotypem F508del/F508del. Pomocí FIS jsme u 70 pacientů potvrdili významnou převahu ETI nad tezakaftorem/ivakaftorem *in vitro*. Opět byla pozorována značná variabilita AUC mezi jednotlivými pacienty. V této kohortě bylo 38 jedinců na léčbě ETI alespoň 12 měsíců. Provedli jsme korelační studii *in vitro* výsledků FIS a *in vivo* klinických dat (FEV1, BMI, chloridy v potu).

Bylo pozorováno signifikantní zlepšení sledovaných parametrů na léčbě u všech pacientů, ale nebyla nalezena žádná signifikantní korelace mezi FIS (hodnotami AUC) a změnou FEV1, BMI nebo chloridů v potu. **Publikováno ve Furstova *et al.*, 2024.**

4) Vyvinuli jsme nový diagnostický nástroj na základě obrazové analýzy morfologie střevních organoidů (ROMA, Rectal organoid morphology analysis), který rozlišuje mezi jedinci s CF a bez CF na základě morfologických rozdílů mezi organoidy.

Bylo vyšetřeno 167 pacientů s CF a 22 zdravých jedinců (non-CF). Na základě obrazové analýzy byly vypočteny dva morfologické indexy: IR (intensity ratio, poměr intenzity) kvantifikující přítomnost centrálního lumen a CI (circularity index, index kulatosti) měřící oválnost organoidů. Perfektní diskriminace (AUC=1) byla dosažena pomocí lineární diskriminační analýzy. Hodnoty IR a CI spolehlivě odlišily CF a non-CF organoidy. **Publikováno v Cuyx *et al.*, 2021.**

Následně jsme publikovali podrobný protokol, na základě kterého by metoda měla být reprodukovatelná i v dalších laboratořích. **Publikováno v Cuyx *et al.*, 2022.**

## Diskuze

Ve výše uvedených publikacích jsme ukázali, že hodnocení funkce CFTR pomocí střevních organoidů je proveditelné, přenosné a opakovatelné. Pozorovaná variabilita *in vitro* odpovědi u pacientů se stejným genotypem na lumakaftor/ivakaftor se zdá obdobná jako variabilita terapeutické odpovědi v klinické studii (Wainwright *et al.*, 2015). U několika vzácných mutací jsme nově prokázali *in vitro* efektivitu CFTR modulátorů a využili tuto metodu u dvou pacientů v klinické praxi.

Jako první jsme srovnali nejnovější CFTR modulátor ETI s lékem předchozí generace, tezakaftor/ivakaftor a prokázali jsme signifikantně lepší *in vitro* výsledky pro ETI. Naše data zdůraznily individuální variabilitu *in vitro* odpovědi na CFTR modulátory.

Přestože vyšetření organoidů poměrně spolehlivě rozlišuje mezi jednotlivými CFTR modulátory (ETI vs. tezakaftor/ivakaftor), dle našich výsledků FIS není spolehlivým prediktorem rozsahu klinické odpovědi u pacientů s CF a genotypem F508del/F508del. Zdůraznili jsme limitace FIS vyšetření střevních organoidů jako prediktivního nástroje u homogenní skupiny pacientů s CF, kteří mají nasazenou stejnou léčbu. Lepší FIS výsledek nepředpovídá lepší klinickou odpověď.

Sekvenací *CFTR* jsme detekovali několik nových *CFTR* variant, některé klasifikované jako varianty nejasného významu, ale neprokázali jsme jejich vliv na variabilitu *in vitro* nebo *in vivo* výsledků. S ohledem na zmíněnou variabilitu léčebné odpovědi stále předpokládáme, že individuální genetické rozdíly (v *CFTR* nebo i mimo *CFTR*) mohou reakci na léčbu ovlivnit, což zdůrazňuje potřebu personalizovaného přístupu k léčebné strategii u pacientů s CF.

V analýze morfologie střevních organoidů jsme ukázali, že ROMA představuje slibný, proveditelný a vysoce diskriminační diagnostický nástroj k odlišení CF a non-CF organoidů. Může nabídnout alternativu k současným funkčním testům CFTR a tím zvýšit diagnostickou přesnost, zejména v složitých případech, kde jsou tradiční metody nejednoznačné. Další validace bude nutná u pacientů s nejasnou diagnózou.

Celkově naše výsledky ukázaly, že studium funkce CFTR proteinu a její záchranu na střevních organoidech otevírá cestu k personalizované terapii, což je relevantní zejména pro pacienty se vzácnými mutacemi, kteří nejsou běžně zařazeni do klinických studií.

## **Závěr**

Publikace v této disertační práci se soustředily na výzkum využití tkáňových kultur pacientů s cystickou fibrózou – střevních organoidů k *in vitro* hodnocení efektivity specifické terapie CFTR modulátory. Jedním z cílů byla predikce léčebné odpovědi u pacientů s CF na základě testu *in vitro*, a to včetně odpovědi pacientů se vzácnými mutacemi, u nichž taková analýza otevírá cestu skutečné personalizované medicíny. Druhá část dizertace se týkala zhodnocení a využití střevních organoidů v diagnostice CF.

FIS prokázalo efektivitu při stratifikaci *in vitro* odpovědi na různé kombinace CFTR modulátorů: ivakaftor, lumakaftor/ivakaftor, tezakaftor/ivakaftor a elexakaftor/tezakaftor/ivakaftor (ETI) jak u skupiny pacientů s různým *CFTR* genotypem (Ramalho *et al.*, 2021), tak i u skupiny pacientů s totožným genotypem F508del/F508del (Furstova *et al.*, 2021, 2024). Obecně byla pozorována značná interindividuální variabilita, a to včetně skupiny pacientů F508del/F508del, což naznačuje, že existují další faktory mimo samotnou *CFTR*

mutaci, které mohou ovlivnit terapeutickou odpověď (např. další genetické faktory).

Studie prováděné na našem pracovišti ukázaly významně lepší *in vitro* odpověď na ETI ve srovnání s CFTR modulátorem starší generace tezakaftor/ivakaftor u skupiny pacientů se stejným genotypem F508del/F508del. Nicméně variabilita *in vitro* odpovědi zdůrazňuje komplexitu efektu CFTR modulátorů a ukazuje potenciální roli unikátních variant *CFTR*, které by na tuto variabilitu mohly mít vliv. Z tohoto důvodu jsme prováděli sekvenaci celého *CFTR* genu. Objevili jsme několik nových a dosud nepopsaných *CFTR* variant, nicméně se nám nepodařilo prokázat jejich případný vliv na *in vitro* nebo *in vivo* odpověď na CFTR modulátory (Furstova *et al.*, 2021).

Korelační studie *in vitro* výsledků FIS s klinickými parametry (FEV1, BMI, chloridy v potu) pacientů na léčbě CFTR modulátory (konkrétně ETI) neprokázala souvislost mezi rozsahem *in vitro* odpovědi (tj. velikost AUC získané pomocí FIS) a rozsahem klinické odpovědi. Poukázali jsme na limit vyšetření střevních organoidů pomocí FIS u skupiny pacientů s CF se stejným genotypem a stejnou léčbou (Furstova *et al.*, 2024).

Na belgickém pracovišti se autorka podílela na optimalizaci diagnostické metody ROMA, která by se mohla stát spolehlivým nástrojem k odlišení morfologie CF a non-CF organoidů. Dále je nutná optimalizace i na organoidech získaných od pacientů s nejasnou diagnózou. Publikovali jsme podrobný laboratorní protokol (Cuyx *et al.*, 2021, 2022).

Přestože většina CF pacientů může být léčena CFTR modulátory, stále existují jedinci se vzácným *CFTR* genotypem, pro které je personalizovaný přístup ke hledání terapie jediná šance, jak specifickou léčbu získat. Na základě našich *in vitro* experimentů získali specifickou léčbu CFTR modulátory 2 pacienti v Belgii

(Ramalho *et al.*, 2021) a na dané léčbě došlo k významnému zlepšení klinických parametrů (FEV1, chloridy v potu). Na našem domovském pracovišti jsme *in vitro* výsledky FIS přiložili k úspěšným žádostem o schválení CFTR modulátorů u 3 pacientů se vzácným *CFTR* genotypem.

Výzkum střevních organoidů představuje významný posun v personalizované medicíně s potenciálním využitím i v diagnostice nejasných případů. S ohledem na limity vyšetření je ale třeba dále zkoumat a optimalizovat modely testování CFTR modulátorů, např. elektrofyziologickým vyšetřením tkáňových kultur nosního epitelu. Další výzkum by se měl zaměřit i na zkoumání genetických a environmentálních faktorů, které mohou přispívat k variabilitě *in vitro* a *in vivo* odpovědi na léčbu, s konečným cílem optimalizovat léčebné strategie pro všechny pacienty s CF.

## **Shrnutí**

Vyšetřovali jsme tkáňové kultury střevních organoidů získaných od pacientů s cystickou fibrózou. Stratifikovali jsme *in vitro* léčebnou odpověď na CFTR modulátory pomocí forskolinem indukovaného bobtnání organoidů (FIS). Popsali jsme *in vitro* odpovědi na několik CFTR modulátorů u rozsáhlé skupiny 97 belgických pacientů s 28 různými *CFTR* genotypy. Záchrana funkce CFTR kanálu pomocí CFTR modulátorů korelovala s klinickým zlepšením popsáním v literatuře u pacientů s odpovídajícím genotypem. Vyšetřili jsme několik vzácných *CFTR* variant (E92K, Q237E, R334W a L159S), u kterých jsme prokázali efektivitu CFTR modulátorů *in vitro*. Dva pacienti se vzácnými variantami získali léčbu na základě našich *in vitro* výsledků a na léčbě u nich došlo ke zlepšení klinických parametrů.

Jako první jsme prokázali významně lepší *in vitro* efekt nejnovějšího CFTR modulátoru elexakaftor/tezakaftor/ivakaftor (ETI) u homogenní skupiny pacientů s genotypem F508del/F508del ve srovnání s lékem předchozí generace tezakaftor/ivakaftor.

Pomocí sekvenace *CFTR* genu jsme odhalili několik nových variant, nicméně jsme neprokázali jejich vliv na *in vitro* nebo *in vivo* léčebnou odpověď na *CFTR* modulátory.

Provedli jsme korelaci *in vitro* výsledků FIS s klinickými parametry (FEV1, BMI, chloridy v potu) u 38 pacientů na léčbě ETI. Přestože u všech pacientů došlo k významnému zlepšení klinických parametrů, neprokázali jsme souvislost mezi rozsahem *in vitro* odpovědi a rozsahem klinické odpovědi. Poukázali jsme na limit vyšetření střevních organoidů pomocí FIS u skupiny pacientů se stejným genotypem a stejnou léčbou.

Vyvinuli jsme diagnostickou metodu založenou na obrazové analýze střevních organoidů za využití morfologických rozdílů CF a non-CF organoidů ROMA (rectal organoid morphology analysis). Vyšetřili jsme 167 CF pacientů a 22 zdravých kontrol. Na základě rozdílu v intenzitě fluorescence a přítomnosti lumen organoidů, a tvaru organoidů jsme vypočítali dva indexy: IR (intensity ratio, poměr intensity) a CI (circularity index, index kulatosti). Pomocí lineární diskriminační analýzy hodnoty IR a CI spolehlivě odlišily CF a non-CF organoidy.

Naše výsledky ukázaly značnou individuální variabilitu *in vitro* odpovědi na *CFTR* modulátory, což zdůrazňuje potřebu personalizovaného přístupu k léčebné strategii a potřebu *in vitro* studia funkce *CFTR*.

## Summary

We investigated intestinal organoids derived from patients with cystic fibrosis. We stratified *in vitro* treatment response to *CFTR* modulators using forskolin-induced swelling assay (FIS) in organoids. We described *in vitro* responses to several *CFTR* modulators in a large group of 97 Belgian patients with 28 different *CFTR* genotypes. The rescue of *CFTR* channel function by *CFTR* modulators correlated with improvement in clinical parameters reported in the literature for patients with corresponding genotypes. We examined several rare *CFTR* variants



(E92K, Q237E, R334W, L159S) and demonstrated the efficacy of CFTR modulators *in vitro*. Two patients with rare variants received treatment based on our *in vitro* analysis, resulting in significant clinical improvement.

We demonstrated a significantly better *in vitro* effect of the newest CFTR modulator, elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI), in a homogeneous group of CF patients with the F508del/F508del genotype compared to the previous-generation drug tezacaftor/ivacaftor.

Using *CFTR* gene sequencing, we identified several new variants; however, we did not demonstrate their impact on *in vitro* or *in vivo* treatment response to CFTR modulators.

We correlated the *in vitro* FIS results with clinical parameters (FEV1, BMI, sweat chloride concentration) in 38 patients undergoing treatment with ETI. Although all patients showed significant improvement in clinical parameters, we did not prove any correlation between the extent of the *in vitro* response and the extent of the clinical response. We pointed out the limitations of examining intestinal organoids using FIS in a group of patients with the same genotype and the same treatment.

We developed a diagnostic tool based on image analysis of intestinal organoids using morphological differences between CF and non-CF organoids ROMA (rectal organoid morphology analysis). We examined 167 CF patients and 22 healthy controls. Based on differences in fluorescence intensity, lumen presence, and organoid shape, we calculated two indices: IR (intensity ratio) and CI (circularity index). Using linear discriminant analysis, IR and CI values reliably distinguished CF and non-CF organoids.

Our results highlighted individual variability of *in vitro* response to CFTR modulators, emphasizing the need for a personalized approach to therapeutic strategy and the necessity of *in vitro* studies of CFTR function.

## Literatura

- Amato, F. *et al.* (2019) ‘Two CFTR mutations within codon 970 differently impact on the chloride channel functionality’, *Human Mutation*, 40(6), pp. 742–748. doi: 10.1002/humu.23741.
- Bedwell, D. *et al.* (1997) ‘Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line.’, *Nat Med* 3, pp. 1280–1284. doi: 10.1038/nm1197-1280.
- Berkers, G. *et al.* (2019) ‘Rectal Organoids Enable Personalized Treatment of Cystic Fibrosis’, *Cell Reports*, 26(7), pp. 1701-1708.e3. doi: /10.1016/j.celrep.2019.01.068.
- Bobadilla, J.L. *et al.* (2002) ‘Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations - Correlation with incidence data and application to screening’, *Human Mutation*, pp. 575–606. doi: 10.1002/humu.10041.
- de Boeck, K. *et al.* (2014) ‘The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis’, *Journal of Cystic Fibrosis*, 13(4), pp. 403–409. doi: 10.1016/j.jcf.2013.12.003.
- de Boeck, K. and Amaral, M.D. (2016) ‘Progress in therapies for cystic fibrosis’, *The Lancet Respiratory Medicine*. Lancet Publishing Group, pp. 662–674. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0.
- Brewington, J.J. *et al.* (2018) ‘Detection of CFTR function and modulation in primary human nasal cell spheroids’, *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(1), pp. 26–33. doi: 10.1016/j.jcf.2017.06.010.
- Capurro, V. *et al.* (2021) ‘Partial rescue of f508del-cftr stability and trafficking defects by double corrector treatment’, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10). doi: 10.3390/ijms22105262.
- *CFTR2 database* (no date) <https://cftr2.org/>.
- Chen, K.G. *et al.* (2019) ‘Pharmacological analysis of CFTR variants of cystic fibrosis using stem cell-derived organoids’, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, pp. 2126–2138 doi: 10.1016/j.drudis.2019.05.029.
- Cholon, D.M. *et al.* (2014) *Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of DF508 CFTR in cystic fibrosis*. *Sci Transl Med*. 2014;6(246):246ra96 doi: doi: 10.1126/scitranslmed.3008680.
- Cholon, D.M. and Gentsch, M. (2018) ‘Recent progress in translational cystic fibrosis research using precision medicine strategies’, *Journal of Cystic Fibrosis*. Elsevier B.V., pp. S52–S60. doi: 10.1016/j.jcf.2017.09.005.

- Clancy, J.P. *et al.* (2019) ‘CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions’, *Journal of Cystic Fibrosis*. Elsevier B.V., pp. 22–34. doi: 10.1016/j.jcf.2018.05.004.
- Collaco, J.M. *et al.* (2010) ‘Quantification of the relative contribution of environmental and genetic factors to variation in cystic fibrosis lung function’, *Journal of Pediatrics*, 157(5). Available at: doi: 10.1016/j.jpeds.2010.05.018.
- Corvol, H. *et al.* (2015) ‘Genome-wide association meta-analysis identifies five modifier loci of lung disease severity in cystic fibrosis’, *Nature Communications*, 6. doi: 10.1038/ncomms9382.
- Corvol, H. *et al.* (2018) ‘SLC26A9 gene is associated with lung function response to ivacaftor in patients with cystic fibrosis’, *Front Pharmacol.* 2018;9:828. Doi: 10.3389/fphar.2018.00828.
- Cutting, G.R. (2010) ‘Modifier genes in Mendelian disorders: The example of cystic fibrosis’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1214(1), pp. 57–69. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05879.x.
- Cutting, G.R. (2015) ‘Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application’, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, pp. 45–56. doi: 10.1038/nrg3849.
- Cuyx, S. *et al.* (2021) ‘Rectal organoid morphology analysis (ROMA) as a promising diagnostic tool in cystic fibrosis’, *Thorax*, 76(11), pp. 1146–1149. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216368.
- Cuyx, S. *et al.* (2022) ‘Rectal Organoid Morphology Analysis (ROMA): A Diagnostic Assay in Cystic Fibrosis’, *Journal of Visualized Experiments*, 2022(184). doi: 10.3791/63818.
- *Cystic Fibrosis Mutation Database* (no date) <http://www.genet.sickkids.on.ca>.
- Dekkers, J.F. *et al.* (2013) ‘A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids’, *Nature Medicine*, 19(7), pp. 939–945. doi: 10.1038/nm.3201.
- Dekkers, J.F. *et al.* (2016) *Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis*. *Sci Transl Med.* 2016;8(344). doi: 10.1126/scitranslmed.aad8278.
- Dekkers, J.F., van der Ent, C.K. and Beekman, J.M. (2013) ‘Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids’, *Rare Diseases*, 1(1), p. e27112. doi: 10.4161/rdis.27112.

- Farrell, P.M. *et al.* (2017) ‘Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation’, *Journal of Pediatrics*, 181, pp. S4-S15.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2016.09.064.
- Ferreira, F.C., Buarque, C.D. and Lopes-Pacheco, M. (2024) ‘Organic Synthesis and Current Understanding of the Mechanisms of CFTR Modulator Drugs Ivacaftor, Tezacaftor, and Elexacaftor’, *Molecules*. 2024;29(4):821. doi: 10.3390/molecules29040821.
- Fiedorczuk, K. and Chen, J. (2022) ‘Mechanism of CFTR correction by type I folding correctors’, *Cell*, 185(1), pp. 158-168.e11. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.009.
- Flume, P.A. *et al.* (2012) ‘Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation’, *Chest*, 142(3), pp. 718–724. doi: 10.1378/chest.11-2672.
- Fulcher, M.L. and Randell, S.H. (2013) ‘Human nasal and tracheo-bronchial respiratory epithelial cell culture’, *Methods in Molecular Biology*, 945, pp. 109–121. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7\_8.
- Furstova, E. *et al.* (2021) ‘Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis’, *Journal of Cystic Fibrosis*. 2022;21(2):243-245. doi: 10.1016/j.jcf.2021.07.006.
- Furstova, E. *et al.* (2024) ‘Precision medicine in cystic fibrosis: predictive role of forskolin-induced swelling assay’, *European Respiratory Journal*, 63(4). doi: 10.1183/13993003.00156-2024.
- Van Goor, F. *et al.* (2009) Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(44):18825-18830. doi: 10.1073/pnas.0904709106.
- Hanssens, L.S., Duchateau, J. and Casimir, G.J. (2021) ‘Cftr protein: Not just a chloride channel?’, *Cells*. 2021;10(11):2844. doi: 10.3390/cells10112844.
- Heijerman, H.G.M. *et al.* (2019) ‘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’, *The Lancet*, 394(10212), pp. 1940–1948. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32597-8.
- Jih, K.Y. *et al.* (2017) ‘CFTR potentiators: from bench to bedside’, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd, pp. 98–104. doi: 10.1016/j.coph.2017.09.015.
- Keegan, D.E. and Brewington, J.J. (2021) ‘Nasal epithelial cell-based models for individualized study in cystic fibrosis’, *IJMS*. 2021;22(9):4448. doi: 10.3390/ijms22094448.

- Laselva, O. *et al.* (2020) ‘The cftr mutation c.3453g > c (d1152h) confers an anion selectivity defect in primary airway tissue that can be rescued by ivacaftor’, *Journal of Personalized Medicine*, 10(2). doi: 10.3390/jpm10020040.
- Mall, M.A., Mayer-Hamblett, N. and Rowe, S.M. (2020) ‘Cystic fibrosis: Emergence of highly effective targeted therapeutics and potential clinical implications’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(10), pp. 1193–1208. doi: 10.1164/rccm.201910-1943SO.
- Marson, F.A.L. (2018) ‘Disease-modifying genetic factors in cystic fibrosis’, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 296–308. doi: 10.1097/MCP.0000000000000479.
- McCague, A.F. *et al.* (2019) ‘Correlating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function with clinical features to inform precision treatment of cystic fibrosis’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 199(9), pp. 1116–1126. doi: 10.1164/rccm.201901-0145OC.
- Mézinèle, J., Ruffin, M., Guillot, L., Boëlle, P.Y., *et al.* (2022) ‘Factors Predisposing the Response to Lumacaftor/Ivacaftor in People with Cystic Fibrosis’, *Journal of Personalized Medicine*, 12(2). doi: 10.3390/jpm12020252.
- Mézinèle, J., Ruffin, M., Guillot, L. and Corvol, H. (2022) ‘Modifier Factors of Cystic Fibrosis Phenotypes: A Focus on Modifier Genes’, *International Journal of Molecular Sciences* 2022;23(22):14205. doi: 10.3390/ijms232214205.
- Middendorp, S. *et al.* (2014) ‘Adult stem cells in the small intestine are intrinsically programmed with their location-specific function’, *Stem Cells*, 32(5), pp. 1083–1091. doi: 10.1002/stem.1655.
- Middleton, P.G. *et al.* (2019) ‘Elexacaftor–Tezacaftor–Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele’, *New England Journal of Medicine*, 381(19), pp. 1809–1819. doi: 10.1056/nejmoa1908639.
- Molinski, S. V *et al.* (2017) ‘O rkambi® and amplifier co-therapy improves function from a rare CFTR mutation in gene-edited cells and patient tissue’, *EMBO Molecular Medicine*, 9(9), pp. 1224–1243. doi: 10.15252/emmm.201607137.
- Orenti A *et al.* (2022) *ECFSPR Annual Report 2020*.
- Paranjapye, A. *et al.* (2020) ‘Genetic variation in CFTR and modifier loci may modulate cystic fibrosis disease severity’, *Journal of Cystic Fibrosis*, 19, pp. S10–S14. doi: 10.1016/j.jcf.2019.11.001.

- Pranke, I. *et al.* (2019) ‘Emerging therapeutic approaches for cystic fibrosis. From gene editing to personalized medicine’, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fphar.2019.00121.
- Ramalho, A.S. *et al.* (2021) ‘Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis’, *European Respiratory Journal*, 57(1). doi: 10.1183/13993003.02426-2019.
- Ramsey, B.W. *et al.* (2011) A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1663-1672.. doi: 10.1056/NEJMoa1105185
- Riordan, J.R. (2008) ‘CFTR function and prospects for therapy’, *Annual Review of Biochemistry*, pp. 701–726. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142532.
- Rowe, S.M. *et al.* (2017) ‘Tezacaftor–Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis’, *New England Journal of Medicine*, 377(21), pp. 2024–2035. doi: 10.1056/nejmoa1709847.
- Rueda-Nieto, S. *et al.* (2022) ‘Analysis of the genotypic profile and its relationship with the clinical manifestations in people with cystic fibrosis: study from a rare disease registry’, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1). doi: 10.1186/s13023-022-02373-y.
- Sato, T. *et al.* (2011) ‘Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett’s epithelium’, *Gastroenterology*, 141(5), pp. 1762–1772. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.050.
- Sato, T. and Clevers, H. (2013) ‘Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1190–1194. doi: 10.1126/science.1234852.
- Schögler, A. *et al.* (2017) ‘Characterization of pediatric cystic fibrosis airway epithelial cell cultures at the air-liquid interface obtained by non-invasive nasal cytology brush sampling’, *Respiratory Research*, 18(1). doi: 10.1186/s12931-017-0706-7.
- Shamsuddin, A.K.M. and Quinton, P.M. (2014) ‘Native small airways secrete bicarbonate’, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(4), pp. 796–804. doi: 10.1165/rcmb.2013-0418OC.
- Sosnay, P.R. *et al.* (2013) ‘Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene’, *Nature Genetics*, 45(10), pp. 1160–1167. doi: 10.1038/ng.2745.
- Strug, L.J. *et al.* (2016) ‘Cystic fibrosis gene modifier SLC26A9 modulates airway response to CFTR-directed therapeutics’, *Human Molecular Genetics*, 25(20), pp. 4590–4600. doi: 10.1093/hmg/ddw290.

- Sun, H. *et al.* (2014) ‘TGF-beta downregulation of distinct chloride channels in cystic fibrosis-affected epithelia’, *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0106842.
- Taylor-Cousar, J.L. *et al.* (2017) ‘Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del’, *New England Journal of Medicine*, 377(21), pp. 2013–2023. doi: 10.1056/nejmoa1709846.
- Vanscoy, L.L. *et al.* (2007) ‘Heritability of lung disease severity in cystic fibrosis’, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 175(10), pp. 1036–1043. doi: 10.1164/rccm.200608-1164OC.
- Veit, G. *et al.* (2016) ‘From CFTR biology toward combinatorial pharmacotherapy: Expanded classification of cystic fibrosis mutations’, *Molecular Biology of the Cell*, 27(3), pp. 424–433. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0935.
- Veit, G. *et al.* (2020) ‘Allosteric folding correction of F508del and rare CFTR mutants by elxacaftor-tezacaftor-ivacaftor (Trikafta) combination’, *JCI Insight*, 5(18). doi: 10.1172/JCI.INSIGHT.139983.
- Vonk, A.M. *et al.* (2020) ‘Protocol for Application, Standardization and Validation of the Forskolin-Induced Swelling Assay in Cystic Fibrosis Human Colon Organoids’, *STAR Protocols*, 1(1). doi: 10.1016/j.xpro.2020.100019.
- Wainwright, C.E. *et al.* (2015) ‘Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR’, *New England Journal of Medicine*, 373(3), pp. 220–231. doi: 10.1056/nejmoa1409547.
- Van De Wetering, M. *et al.* (2015) ‘Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients’, *Cell*, 161(4), pp. 933–945. doi: 10.1016/j.cell.2015.03.053.
- Wilschanski, M. (2012) ‘Class 1 CF mutations’, *Frontiers in Pharmacology*, 2012;3.3 JUN. doi: 10.3389/fphar.2012.00117.
- Zhang, Z. and Chen, J. (2016) ‘Atomic Structure of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator’, *Cell*, 167(6), pp. 1586-1597.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.014.

## Přehled publikační činnosti

Původní vědecké práce in extenso, které jsou podkladem disertace.

Furstova E, Drevinek P, Novotna S, *et al.* Precision medicine in cystic fibrosis: predictive role of forskolin-induced swelling assay. *Eur Respir J.* 2024;63(4):2400156.

European Respiratory Journal, IF 24,9, Quartile: Q1

Furstova E, Dousova T, Beranek J, *et al.* Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* 2022;21(2):243-245.

Journal of Cystic Fibrosis, IF 5,482, Quartile: Q1

Cuyx S, Ramalho AS, Corthout N, *et al.* Rectal organoid morphology analysis (Roma): a diagnostic assay in cystic fibrosis. *JoVE.* 2022;(184):63818.

Journal of Visualized Experiments, IF 1,2, Quartile: Q3

Cuyx S, Ramalho AS, Corthout N, *et al.* *Rectal organoid morphology analysis (Roma) as a promising diagnostic tool in cystic fibrosis.* *Thorax.* 2021;76(11):1146-1149.

Thorax, IF 10,307, Quartile: Q1

Ramalho AS, Furstová E, Vonk AM, *et al.* *Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis.* *Eur Respir J.* 2021;57(1):1902426.

European Respiratory Journal, IF 24,9, Quartile: Q1



Přednášky, plakátová sdělení na odborných setkáních.

ECFS konference, Liverpool, 2019

E-poster prezentace: Investigation of in vitro treatment response to CFTR modulators in patients with cystic fibrosis in a cross-sectional intestinal organoid study

ECFS konference, Lyon, Francie, 2020

Poster: A check of the organoid FIS assay reproducibility when performed in a newly established local lab.

14th European CF Young Investigators' Meeting, Paris, France, 2020

Přednáška: Investigation of in vitro treatment response to CFTR-modulators in patients with cystic fibrosis in cross-sectional intestinal organoid study

ECFS konference On-line, 2021

Poster: First report: Kaftrio® vs. Symkevi® in intestinal organoids

ECFS Basic Science conference, Albufeira, Portugalsko, 2022

Poster: Complex CFTR allele p.(PheF508del;Leu467Phe) and the altered in vitro response to CFTR modulators

ECFS konference, Vídeň, Rakousko, 2024

Poster: Complex CFTR allele p.(Phe508del;Leu467Phe): in vitro and clinical response to CFTR modulators

