

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Eva Fürstová**

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

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

Disertační práce

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

**Praha 2024**

**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, 20.06.2024

Eva Fůrstová



**Poděkování:**

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Pavlu Dřevínkovi, Ph.D. a MUDr. Tereze Doušové, Ph.D. za cenné metodické rady a konzultace. Za pomoc v laboratorní práci děkuji kolegyním Mgr. Štěpánce Novotné, Mgr. Malgorzatě Libik, RNDr. Lucii Bořek-Dohalské, Simoně Tomšů a kolegovi Ing. Jakubovi Beránkovi. Kláře Benešové děkuji za podporu a motivaci během celého PhD studia.

## ABSTRAKT

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 cílící 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

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

## SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette
ALI	air-liquid interface (rozhraní médium – vzduch)
ASL	airway surface liquid (tekutina na povrchu dýchacích cest)
ATP	adenosin trifosfát
AUC	area under the curve (plocha pod křivkou)
BMI	body mass index
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CF	cystická fibróza
CF-SPID	cystická fibróza - screening positive, inconclusive diagnosis (CF - pozitivní screening, neuzavřená diagnóza)
CFRD	cystic fibrosis related diabetes (diabetes vázaný na cystickou fibrózu)
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (gen nebo protein)
CFQ-R	cystic fibrosis questionnaire-revised (dotazník kvality života CF pacienta)
CI	circularity index (index kulatosti)
ELX	elexakaftor
ETI	elexakaftor/tezakaftor/ivakaftor
FDA	Food and drug administration
FEV1	forced expiratory volume in 1 second (usilovný expirační objem za 1 s)
FIS	forskolin induced swelling assay (forskolinem indukované bobtnání)
FRT	Fischer Rat Thyroid
HBE	human bronchial epithelial cells (lidské bronchiální epiteliální buňky)
HNE	human nasal epithelial cells (lidské nosní epiteliální buňky)
ICM	intestinal current measurements (měření epiteliálních potenciálů na střevní sliznici)
IR	intensity ratio (poměr intenzity)
IRT	imunoreaktivní trypsinogen
MPLA	multiplex ligation-dependent probe amplification assay
MPS	massive parallel sequencing
NBD	nucleotid binding domain (nukleotid vazující doména)
NPD	nasal potential difference (měření rozdílů nosních potenciálů)
RD	regulatory domain (regulační doména)
ROMA	Rectal organoid morphology analysis (analýza morfologie organoidů)
TMD	transmembrane domain (transmembránová doména)
VUS	variant of unknown significance (varianta nejasného významu)
WT-CFTR	wild type CFTR (běžná sekvence CFTR)

# OBSAH

<b>1</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>9</b>
1.1.	Cystická fibróza.....	9
1.2.	Diagnostika CF .....	10
1.3.	CFTR protein.....	11
1.4.	Funkční třídy <i>CFTR</i> mutací.....	12
1.5.	Léčba CF a CFTR modulátory .....	15
1.6.	Faktory modifikující průběh onemocnění .....	18
1.7.	Buněčné modely CF .....	19
1.7.1.	<i>Tkáňové kultury z bronchiálních epitelálních buněk.....</i>	<i>19</i>
1.7.2.	<i>Tkáňové kultury z nosních epitelálních buněk.....</i>	<i>20</i>
1.7.3.	<i>Tkáňové kultury ze střevních buněk – intestinální organoidy .....</i>	<i>20</i>
1.7.4.	<i>3D kultury respiračního epitelu.....</i>	<i>22</i>
1.7.5.	<i>Funkční vyšetření intestinálních organoidů .....</i>	<i>22</i>
1.8.	Závěr.....	24
<b>2</b>	<b>HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
2.1.	Hypotéza.....	25
2.2.	Cíle práce.....	25
<b>3</b>	<b>METODIKA.....</b>	<b>26</b>
3.1.	Výběr pacientů.....	26
3.2.	Odběr a kultivace střevních organoidů .....	26
3.3.	Forskolinem indukované bobtnání (forskolin induced swelling assay, FIS)..	26
3.4.	Sběr klinických dat a korelace <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> dat.....	27
3.5.	Genetická analýza.....	28
3.6.	Hodnocení morfologie střevních organoidů .....	28
3.7.	Statistická analýza .....	29
<b>4</b>	<b>KOMENTOVANÉ PUBLIKACE .....</b>	<b>30</b>
4.1.	Ramalho AS, Fürstová E, Vonk AM, <i>et al.</i> Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. Eur Respir J. 2021;57(1):1902426. ....	30

4.2.	Furstova E, Dousova T, Beranek J, <i>et al.</i> Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis. <i>Journal of Cystic Fibrosis</i> . 2022;21(2):243-245. ....	45
4.3.	Furstova E, Drevinek P, Novotna S, <i>et al.</i> Precision medicine in cystic fibrosis: predictive role of forskolin-induced swelling assay. <i>Eur Respir J</i> . 2024;63(4):2400156. ....	49
4.4.	Cuyx S, Ramalho AS, Corthout N, <i>et al.</i> Rectal organoid morphology analysis (ROMA) as a promising diagnostic tool in cystic fibrosis. <i>Thorax</i> . 2021;76(11):1146-1149. ....	54
4.5.	Cuyx S, Ramalho AS, Corthout N, <i>et al.</i> Rectal organoid morphology analysis (ROMA): a diagnostic assay in cystic fibrosis. <i>JoVE</i> . 2022;(184):63818. ....	59
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>SHRNUTÍ</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>85</b>

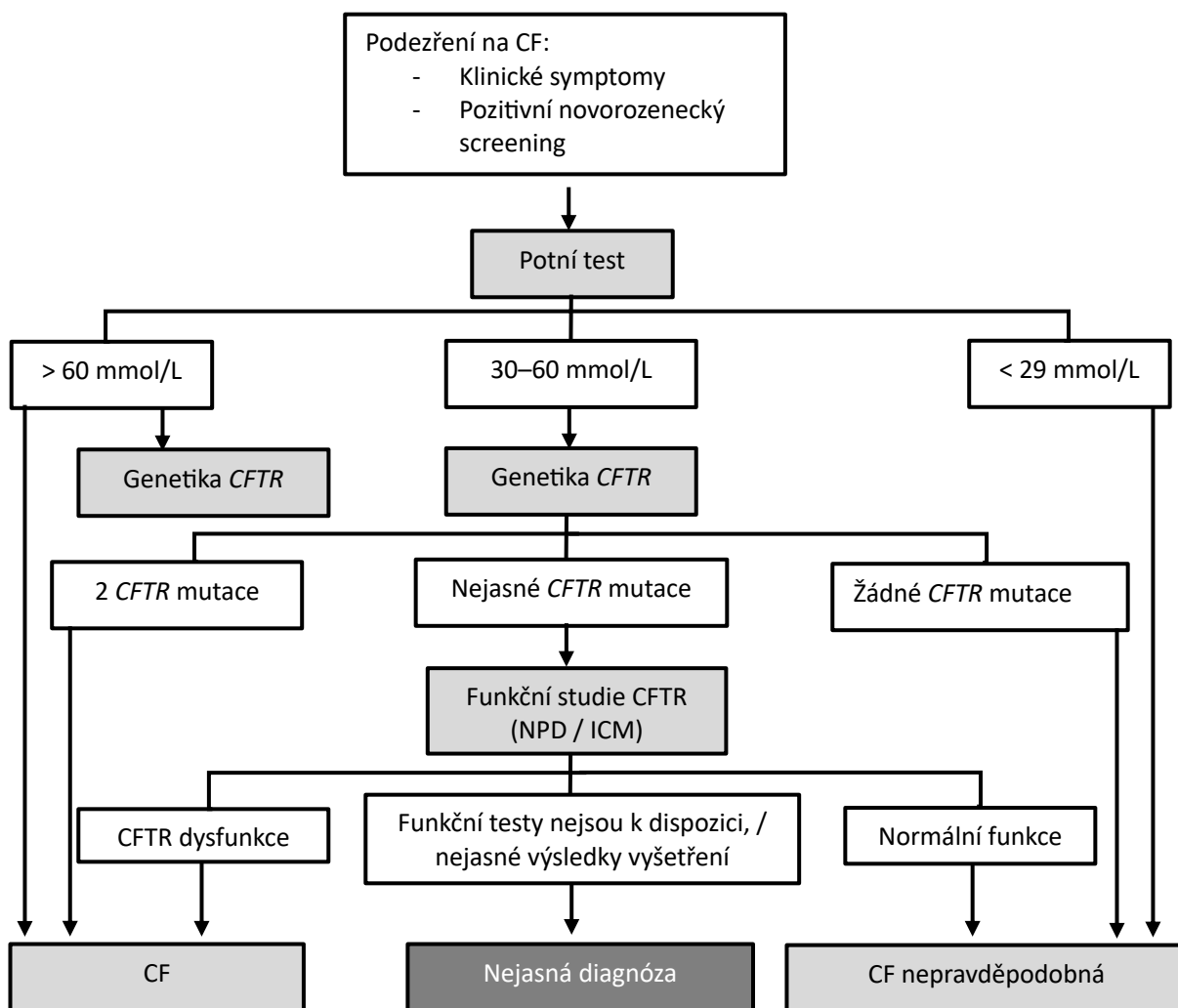
# 1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1. Cystická fibróza

Cystická fibróza (CF) je nejčastější život limitující monogenní onemocnění zejména exokrinních žláz a sekretorického epitelu, které v České republice postihuje 710 pacientů (data z Českého registru CF k 1. červnu 2024). Celosvětově postihuje přibližně 100,000 lidí, zejména kavkazskou populaci (Bobadilla *et al.*, 2002). CF 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). CFTR protein také reguluje aktivitu dalších iontových kanálů a transportérů přítomných na membráně (např. ovlivňuje aktivitu sodíkového transportéru ENaC). Absence nebo dysfunkce CFTR sekundárně vede k abnormálnímu paracelulárnímu transportu vody v důsledku narušeného iontového koncentračního gradientu. Důsledkem je zejména přítomnost viskózního hlenu v dýchacích cestách, zhuštěné žluče ve žlučových cestách a zahuštěného sekretu v pankreatických vývodech, vedoucí k multiorgánovým 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). Postižené jsou ovšem i další orgánové systémy s epitelovou výstelkou jako je střevo, vývodné žlučové cesty v játrech a vývody slinivky břišní. Obstrukce zahuštěným sekretem vývodů žlučových cest může vést ke stagnaci žluči s rizikem rozvoje cholestatického jaterního postižení až cirhózy jater s typickými komplikacemi jako je portální hypertenze; obstrukce vývodů slinivky břišní vede k ztrátě exokrinní funkce slinivky a autodigesci žlázy, což má za následek nedostupnost trávicích enzymů v lumen střeva, zhoršené vstřebávání živin a vysoké riziko malnutrice. Může docházet až k úplné destrukci žlázy a tím i ke ztrátě endokrinní funkce s rozvojem diabetes mellitus (CFRD, cystic fibrosis related diabetes) (Cutting, 2015). Dále jsou postiženy potní žlázy, ve kterých nedochází ke vstřebání chloridových iontů a důsledkem je vysoká hladina chloridů v potu (významné pro diagnostiku). U mužů je navíc postižen i reprodukční trakt obstrukční azoospermii.

## 1.2. Diagnostika CF

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). Běžně užívaný diagnostický algoritmus viz obr. 1.



**Obr. 1.** Diagnostický algoritmus CF, adaptováno dle Farrell *et al.*, 2017. NPD – nasal potential difference (měření rozdílů nosních potenciálů), ICM – instestinal current measurements (měření trans epiteliálních potenciálů na střevní sliznici).

V České republice se od roku 2009 na včasné diagnostice významně podílí novorozenecký screening. V suché kapce krve se vyšetřuje hladina imunoreaktivního

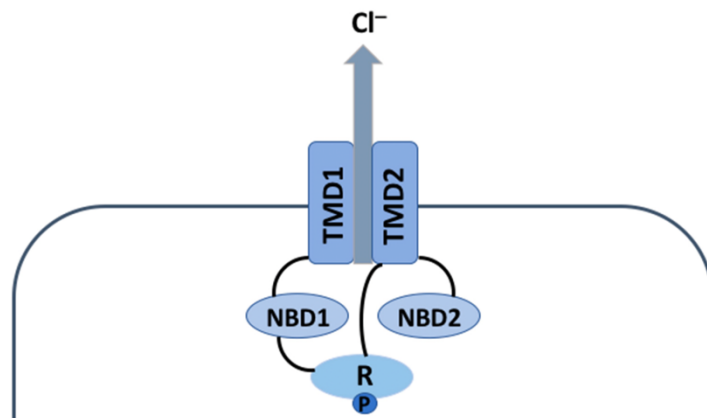


trypsinogenu (IRT), který svou zvýšenou koncentrací může ukázat na jedince s vyšším rizikem onemocnění CF. Při abnormálním IRT se následně ze stejného vzorku suché kapky krve provádí genetické vyšetření pomocí panelu 50 nejčastějších mutací v dané populaci. Screening-pozitivní jedinci jsou následně odesláni na potní test, tj. vyšetření chloridů v potu. Hodnoty nad 60 mmol/l jsou přesvědčivé pro diagnózu CF. Dále se pacient odesílá na genetické vyšetření *CFTR* genu ze žilní krve, ke confirmaci genotypu, zjištěného ve screeningu, nebo k podrobnějšímu vyšetření pomocí sekvenace celého genu. Genetické vyšetření se provádí i v případě středně zvýšených hodnot chloridů v potu (30–60 mmol/l). Nicméně stále existují situace, ve kterých není diagnóza jednoznačná, např. novorozenci u kterých vychází pozitivní novorozenecký screening, ale mají pouze středně zvýšené chloridy v potu (30–60 mmol/l) a jen jednu nebo žádnou patogenní *CFTR* variantu, anebo mají normální hodnotu chloridů v potu a dvě *CFTR* varianty, z nichž minimálně jedna má nejasnou příčinnou souvislost dle databáze CFTR2. V České republice se v registru pacientů s CF sleduje takovýchto 54 pacientů s pozitivním novorozeneckým screeningem a neuzavřenou diagnózou, tzv. CF-SPID (cystic fibrosis – screening positive, inconclusive diagnosis). Z dat z registru tedy vyplývá, že u 7 % jedinců v ČR nemáme zcela vyloučenou / potvrzenou diagnózu CF. U těchto pacientů by bylo vhodné provést další funkční diagnostické testy, jako je měření rozdílů elektrických potenciálů na nosní sliznici (nasal potential difference, NPD) nebo měření transepiteliálních potenciálů na vzorcích střevní sliznice (intestinal current measurements, ICM). Tato vyšetření však nejsou k dispozici v běžné klinické praxi. Existují i pacienti screening-negativní s klinickými příznaky CF, u kterých nemůžeme dostupnými diagnostickými metodami spolehlivě vyloučit CF. Všichni pacienti s nejasnou diagnózou se dlouhodobě sledují a čeká se na jasnější manifestaci nebo vyloučení CF. Pro tyto jedince chybí další diagnostické nástroje a možnosti, které by pomohly jednoznačně rozhodnout o diagnóze.

### 1.3. CFTR protein

CFTR patří do ABC (ATP-binding cassette) rodiny transportních proteinů. Je to polypeptid skládající se ze dvou pseudosymetrických polovin spojených přes regulační doménu (regulatory domain, RD). Každá polovina CFTR obsahuje transmembránovou doménu (TMD), která formuje vlastní kanál pro průchod iontů, a nukleotid-vázající cytoplasmatickou doménu (nucleotide-binding domain, NBD), která váže ATP, viz obr.

2. Molekulární struktura CFTR je popsána ve dvou konformacích: (1) uzavřená, kdy se RD nachází mezi dvěma NBD a kanál je uzavřen pro průchod iontů, v této chvíli není navázané ATP a protein není fosforylován; (2) otevřená, kdy NBD váže ATP, protein je fosforylován a dochází k otevření CFTR kanálu (Zhang & Chen, 2016).



**Obr. 2.** Schematické zobrazení CFTR proteinu, adaptováno dle Hanssens et al., 2021. Na obrázku dvě transmembránové domény TMD1 a TMD2, dvě cytosolové nukleotid-vázající domény NBD1 a NBD2, a jedna regulační doména R, propojující dvě poloviny CFTR proteinu. (P) značí místo fosforylace regulační domény.

#### 1.4. Funkční třídy 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 s tvorbou trunkovaného proteinu, který je určen k degradaci (Wilschanski, 2012). **Třída II** obsahuje mutace způsobující defektní transport chybně složeného CFTR proteinu, dochází k zadržení proteinu v endoplazmatickém retikulu a následně k jeho degradaci. Mimo jiné sem řadíme nejčastější mutaci F508del. **Třída III** je charakterizována defektem v otevírání CFTR kanálu (tzv. gating mutace) s významně sníženou pravděpodobností otevírání kanálu v membráně. **Třída IV** způsobuje snížené proudění iontů přes CFTR kanál. **Třída V** vede

k redukci počtu normálního CFTR proteinu, často z důvodu alternativního místa pro sestřih mRNA (tzv. splicing mutace) a tím generuje jak normální, tak defektní CFTR kanál. **Třída VI** destabilizuje CFTR kanál v plazmatické membráně a dochází rychleji k endocytóze, anebo zpomalení recyklace kanálu zpět na povrch buňky. **Třída VII** jsou mutace obsahující významné delece části *CFTR* genu a netvoří se žádná mRNA a tudíž žádný protein, viz tabulka 1. Dle analýzy evropského registru (zahrnuto 25 394 pacientů napříč 23 evropskými zeměmi) má alespoň na jedné alele 87,2 % pacientů mutaci třídy II; 12,6 % mutaci třídy I; 3,9 % pacientů mutaci třídy III; 3,3 % mutaci třídy IV; 3,0 % mutaci třídy V. Celkově 8,6 % mutací zůstává neznámých (de Boeck *et al.*, 2014). Frekvence mutací funkční třídy VI a VII nebyla popsána. Dle výše uvedené funkční klasifikace a klinického průběhu onemocnění můžeme rozdělit *CFTR* mutace do dvou skupin dle závažnosti průběhu onemocnění: (1) genotyp s vysokým rizikem závažného průběhu, pokud jsou přítomné na obou alelách mutace z tříd I, II, III, nebo VII, tzv. mutace s minimální funkcí; (2) genotyp s nízkým rizikem závažného průběhu, pokud je alespoň na jedné alele přítomná mutace třídy IV, V, nebo VI, tzv. mutace s residuální funkcí (Rueda-Nieto *et al.*, 2022). Residuální funkce CFTR znamená, že mutovaný gen způsobuje klinicky významný funkční deficit iontového kanálu, ale stále určitá funkce přetrvává. Residuální funkce se mezi jednotlivými mutacemi liší a ve funkčních studiích se udává jako % normální funkce CFTR proteinu (% WT-CFTR, wild-type CFTR). Tato funkční klasifikace získává na klinickém významu s ohledem na vývoj nové léčby, která přímo cílí na defektní CFTR protein s nutností různých léčebných strategií k překonání funkčního nebo strukturálního deficitu. Frekvence jednotlivých funkčních tříd se liší v různých populacích (Mall *et al.*, 2020).

Navzdory definované klasifikaci mutací do funkčních tříd je známo, že jednotlivé mutace mohou ovlivnit funkci CFTR na několika úrovních, což brání k jednoznačnému zařazení do funkční třídy. 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 patognomickou pro mutace třídy VI (Veit *et al.*, 2016). Podobný překryv funkčních defektů CFTR zasahující do více funkčních tříd byl popsán i u celé řady dalších mutací, např. R117H, R334W, A455E, R347P a N1303K (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). S rozšířením *in vitro* testování pacient-specifických buněčných modelů může koncept „theratypů“ přinést možnost personalizované léčby, zejména u pacientů se vzácnými *CFTR* mutacemi (Clancy *et al.*, 2019; Dekkers *et al.*, 2016; Cholon & Gentsch, 2018).

Funkční třída	Defekt <i>CFTR</i>	Funkce <i>CFTR</i>	Přítomnost <i>CFTR</i> na membráně	Příklady mutací	Strategie léčby	Genová léčba
I	žádný protein	nefunkční	ne	G542X, W1282X, R553X	obnova syntézy, „read-through“ molekuly	
II	chybné zpracování a intracelulární transport	nefunkční	ne	F508del, N1303K, I507del	korektory a potenciátory, + amplifikátory, + stabilizátory	
III	defektní regulace (otevírání) kanálu	nefunkční	ano	G551D, G178R, G551S	potenciátory	
IV	snížené vedení iontů	snížená	ano	R334W, R117H, R347P	potenciátory	
V	snížené množství proteinu	snížená	snížená	3272-26A>G, A455E, D565G	oprava sestřihu mRNA, amplifikátory	
VI	snížená stabilita proteinu	snížená	snížená	1811+1.6kbA>G	stabilizátory	
VII	žádná mRNA	nefunkční	ne	dele2,3, 1717-1G>A	nelze	

**Tabulka 1. Funkční třídy *CFTR* mutací a terapeutické strategie. Adaptováno dle De Boeck & Amaral, 2016 a Pranke *et al.*, 2019.**

## 1.5. Léčba CF a CFTR modulátory

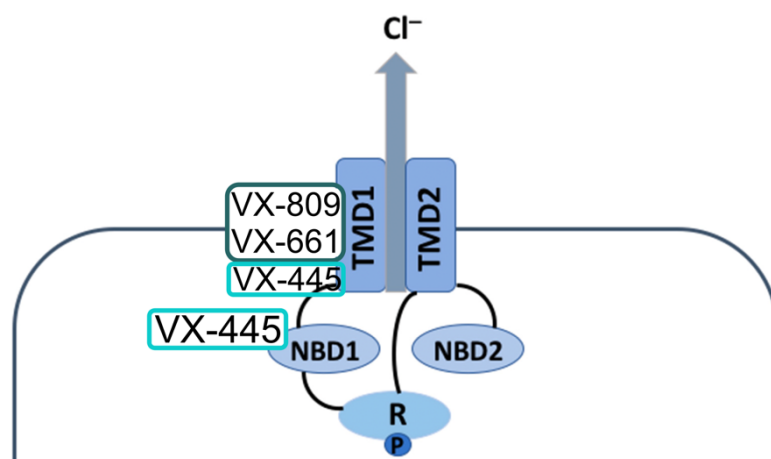
Léčba CF se zakládá zejména na zvládnání symptomů onemocnění postižených orgánů, tzv. symptomatické léčbě. Ke zpomalení progresivního plicního postižení je nutná intenzivní dechová rehabilitace, inhalace mukoaktivních látek (hypertonického solného roztoku), inhalace mukolytik (inhalační DNasa), inhalační antibiotika, dle potřeby častější užívání systémových antibiotik a protizánětlivé léky. Ke zvládnání gastrointestinálních symptomů je nutné zejména substituovat trávicí enzymy, vitamíny rozpustné v tucích a navýšit kalorický příjem.

**CFTR modulátory** jsou malé molekuly, které cílí na defektní CFTR protein na buněčné úrovni a jejich cílem je obnovení funkce defektního proteinu. Mezi tyto molekuly zahrnujeme: I) **potenciátory**, které obnovují funkčnost chloridového kanálu, který je již přítomen na buněčné membráně, II) **korektory**, které opravují maturaci a transport CFTR proteinu z cytoplasmy k plasmatické membráně, III) **stabilizátory**, které prodlužují dobu setrvání CFTR kanálu v plasmatické membráně, IV) **amplifikátory**, které zvyšují expresi CFTR proteinu a tím amplifikují množství defektního proteinu dostupného ke korekci / potenciaci jinými modulátory (Molinski *et al.*, 2017), a V) „**read-through**“ **molekuly**, tzn. molekuly, které umožňují „přečíst“ mRNA s předčasným stop kodonem (Clancy *et al.*, 2019): specifické malé molekuly (antisense oligonukleotidy) pozmění translaci v místě předčasného stop kodonu a umožní inserci příbuzné aminokyseliny a tím tvorbu proteinu v plné délce (Bedwell *et al.*, 1997).

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.

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. V klinické studii byl zaznamenáno signifikantní zlepšení zdravotního stavu, monitorované měřením plicních funkcí a parametru FEV1 (forced expiratory volume in 1 second), nárůstem hmotnosti dle BMI (body mass index) a poklesem koncentrace chloridů v potu (Ramsey *et al.*, 2011). 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). Důsledkem je zvýšení pravděpodobnosti

(četnosti) otevírání CFTR kanálu a facilitace průchodu iontů (Chen *et al.*, 2019), nicméně přesný mechanismus účinku na molekulární úrovni není zcela objasněn (Jih *et al.*, 2017). **Korektory** pozitivně ovlivňují defektní intracelulární transport na buněčnou membránu chybně složeného CFTR proteinu. V současnosti se korektory dělí na **korektory typu I**, které ovlivňují strukturální defekt CFTR tak, že se vážou v hluboké kapse TMD1 domény, jejich afinita je mediovaná zejména tvarovou komplementaritou, která maximalizuje van der Waalsovy interakce a tím mění a stabilizuje alosterickou konfiguraci CFTR, umožňuje správné složení CFTR a jeho transport na membránu (Fiedorczuk & Chen, 2022). Korektory typu II se pravděpodobně vážou na NBD2 doménu (Capurro *et al.*, 2021), více o jejich mechanismu není známo a nemáme ani k dispozici takovou molekulu v klinické praxi. **Korektory typu III** mění alosterickou konformaci CFTR NBD1 domény (Veit *et al.*, 2020), pro elexakaftor bylo následně identifikováno vazebné místo na TMD1 i NBD1 (Ferreira, Buarque & Lopes-Pacheco, 2024). Důležité je, že se liší vazebné místo pro korektory I. a III. typu, efekt na korekci transportu je aditivní (obr. 3).



**Obr. 3.** Schematické zobrazení vazebných míst korektorů CFTR proteinu, adaptováno dle Hanssens *et al.*, 2021. VX-809 (lumakaftor) a VX-661 (tezakaftor) patří mezi korektory typu I, VX-445 (elexakaftor) patří mezi korektory typu III.

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). Lék byl schválen zejména na základě snížení počtu plicních exacerbací, průměrné zlepšení FEV1 nebylo ve srovnání se klinickou studií ivakaftoru tak významné (Wainwright *et al.*, 2015; Rowe *et al.*, 2017).

Další korektor **tezakaftor** (VX-661, Vertex Pharmaceuticals), korektor I. typu, byl schválen v kombinaci s ivakaftorem v roce 2018, indikační kritéria zůstala stejná jako pro kombinaci lumakaftor/ivakaftor, tj. pacienti s nejčastějším genotypem F508del/F508del (Rowe *et al.*, 2017). Nicméně indikační list pro tezakaftor/ivakaftor se rozšířil na skupinu heterozygotů F508del s mutacemi s reziduální funkcí CFTR proteinu (méně než 5 % celkové populace CF pacientů). Nejnovější schválený CFTR modulátor je **elexakaftor** (ELX, VX-445, Vertex Pharmaceuticals), korektor III. typu, s odlišným mechanismem účinku ve srovnání s korektory první generace (lumakaftorem a tezakaftorem). Tato účinná látka se stala součástí trojkombinace elexakaftor/tezakaftor/ivakaftor (ETI) schválené Evropskou lékovou agenturou v roce 2020 pro pacienty, kteří mají alespoň jednu mutaci F508del (Middleton *et al.*, 2019). Terapeuticky lze pomocí CFTR modulátorů ovlivnit funkční třídy II – VI (viz tabulka 1). Pro klinické testování je důležitý počet pacientů s konkrétní mutací *CFTR* genu, a proto se dosud vývoj CFTR modulátorů soustředil zejména na pacienty s nejčastější mutací F508del: cca 50 % evropských pacientů jsou homozygoti varianty F508del a dalších 35–40 % jsou složení heterozygoti (Orenti *et al.*, 2022), nejnovější kombinace CFTR modulátorů je tedy indikovaná pro cca 85-90 % 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. Dále existují pacienti se vzácnými mutacemi, kteří s ohledem na nízkou frekvenci výskytu mutace v populaci nejsou zařazeni do standardního klinického testování, ale potenciálně by mohli z CFTR modulující léčby profitovat (Sosnay *et al.*, 2013; McCague *et al.*, 2019). Další důležitý aspekt je nedostatek znalostí o klinické variabilitě průběhu onemocnění. 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, které byly pozorovány 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).

## 1.6. Faktory modifikující průběh onemocnění

Rozsah orgánového poškození může být velmi rozdílný mezi jednotlivými pacienty. Liší se také mezi pacienty se stejným *CFTR* genotypem. 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*, tyto varianty nazýváme geny modifikující onemocnění (Paranjapye *et al.*, 2020; Cutting, 2010). Byly identifikovány geny, které přispívají k obstrukci dýchacích cest (*TGFB1*, *MBL2*, *EHF*, *APIP*, *Chr20q13.2*, *SLC9A3*, *SLC6A14*), infekci *Pseudomonas aeruginosa* (*MBL2*, *DCTN4*, *SLC6A14*), *CFTR* genotyp primárně určuje dysfunkci exokrinní funkce pankreatu, ale přítomnost dalších variant má vliv na rozvoj CFRD (*TCF7L2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *IGF2BP2*, *SLC26A9*), střevní obstrukce (*MSRA*, *SLC6A14*, *SLC26A9*, *SLC9A3*) a stav výživy (*Chr1p36.1*, *Chr5q14*) (Cutting, 2015). Celogenomová asociační studie identifikovala 5 lokusů modifikující závažnost plicního postižení (*MUC4/MUC20*, *SLC9A3*, HLA II. třídy, *AGTR2/SLC6A14*, *EHF/APIP*) (Corvol *et al.*, 2015). Podobně jako klinický průběh onemocnění, tak i odpověď na *CFTR* modulátory není mezi pacienty uniformní, a to ani mezi pacienty se stejným *CFTR* genotypem. Rozsah záchrany funkce *CFTR* kanálu *in vitro*, ale také zlepšení klinických parametrů, není zcela jasně asociováno s individuální funkční třídou mutace (Flume *et al.*, 2012). Proto se také zkoumají geny modifikující odpověď na *CFTR* modulátory. Francouzská studie asociovala odpověď na ivakaftor s genem *SLC26A9* (Corvol *et al.*, 2018), jiná studie ukázala, že polymorfismus *SLC6A14* genu je asociován se stavem výživy při léčbě kombinací lumakaftor/ivakaftor (Mésinèle *et al.*, 2022). Nejsou zatím prokázány žádné asociace mezi odpovědí na nejnovější kombinaci ETI (Mésinèle *et al.*, 2022). CF byla vždy považována za prototyp monogenního onemocnění, ale s ohledem na současné poznání je možné ji nyní charakterizovat spíše jako multifaktoriální onemocnění ve smyslu interakce enviromentálních a genetických faktorů, jak polymorfismů napříč sekvencí *CFTR* genu, tak s řadou dalších genů modifikujících onemocnění. S těmito poznatky můžeme částečně vysvětlit široké spektrum klinických projevů CF. Modifikující geny mohou hrát důležitou roli při určování komplexního fenotypu CF, ale nutno zmínit, že pouze několik variant



nezávisle koreluje s vybranými klinickými parametry (Marson, 2018). I přesto by objasnění těchto faktorů mohlo přispívat k vysvětlení rozdílů ve fenotypu onemocnění a v léčebné odpovědi na CFTR modulátory a tím zdokonalit predikci terapeutické odpovědi na CFTR modulátory.

## 1.7. Buněčné modely CF

Přestože nová léčba CF, cílicí přímo na CFTR protein na buněčné úrovni, může signifikantně zlepšit zdravotní stav, kvalitu života a celkové přežití pacientů s CF, není k dispozici pro všechny pacienty. Pro některé pacienty je léčba nedostupná kvůli vzácnosti jejich *CFTR* varianty, kvůli čemuž jednoduše nemáme informace o potenciální efektivitě léčby. Jednou z navrhovaných metod řešení je použití buněčných modelů, které umožňují preklinické terapeutické testování CFTR modulátorů *in vitro*. Využívané jsou např. heterologní modely FRT (Fisher Rat Thyroid) buněk, tento model akceptovala FDA (Food and Drug Administration, USA) k rozšíření indikačních mutací pro CFTR modulátory v USA (Van Goor *et al.*, 2009). Nevýhodou tohoto modelu je, že nemusí odpovídat podmínkám v lidském organismu (Amato *et al.*, 2019; Laselva *et al.*, 2020). Naproti tomu laboratorní vyšetření pacient-specifických tkáňových modelů a korelace *in vitro* dat s klinickým průběhem onemocnění nebo klinickou odpovědí na CFTR modulátory může lépe objasnit mechanismy podílející se na fenotypu onemocnění i variabilitě terapeutické odpovědi. Použití takových tkáňových modelů k analýze funkce CFTR proteinu s různými CFTR modulátory může poskytnout preklinické zhodnocení potenciálního benefitu pro pacienta s CF. Hledání specifické a nejvhodnější léčby pro konkrétního pacienta, tj. personalizace léčby, je trendem moderní medicíny (Clancy *et al.*, 2019). Buněčné modely derivované z tkání pacienta mají v tomto ohledu největší relevanci, jelikož reflektují komplexní genetické pozadí každého studovaného pacienta a tvoří jedinečnou cestu k testování individuální léčebné odpovědi na CFTR modulátory a k personalizaci léčby.

### 1.7.1. Tkáňové kultury z bronchiálních epitelálních buněk

Primární lidské bronchiální epitelální (HBE, human bronchial epithelial) kultury pěstované jako ALI (air-liquid interface, pěstované na rozhraní médium – vzduch simulující *in vivo* prostředí respiračního epitelu) jsou důležitou částí výzkumu CF. Měření v Ussingově komůrce můžeme analyzovat elektrofyziologické vlastnosti

epitelu pomocí měření trans-epiteliálního napětí na membráně polarizovaných HBE buněk. Promýváním sérií roztoků se stimuluje CFTR kanál a dochází k efluxu iontů, který můžeme měřit jako změnu elektrických potenciálů na membráně (Sun *et al.*, 2014). Tato technika umožňuje i detekci funkce CFTR proteinu v závislosti na přítomnosti CFTR modulátorů nebo jiných substancí (Van Goor *et al.*, 2009). HBE kultury byly využity k analýze *in vitro* léčebné odpovědi na lumakaftor (Strug *et al.*, 2016). V citované publikaci autoři ukázali, že odpověď buněk na lumakaftor se liší i v závislosti na přítomnosti modifikujících genů (př. *SLC26A9*). HBE kultury navíc umožňují analýzu funkce cílí, zánětlivé odpovědi a fyziologie ASL (airway surface liquid, tekutiny na povrchu dýchacích cest) (Schögler *et al.*, 2017). Významnou nevýhodou tohoto modelu je nutnost získání vzorku bronchiální sliznice ke kultivaci. HBE buňky můžeme získat perioperačně při resekcích plicního parenchymu nebo transplantacích plic, nebo pomocí bronchiální biopsie při bronchoskopii. Zmíněné metody jsou invazivní a je nutné je provádět v celkové anestezii nebo sedaci. Zejména z těchto důvodů nejsou vhodné k rutinnímu vyšetřování. Další nevýhodou je náročnost kultivace HBE kultur i elektrofyziologické analýzy pomocí Ussingovy komory (Fulcher & Randell, 2013), které vyžaduje také vysoce specializované technické zázemí.

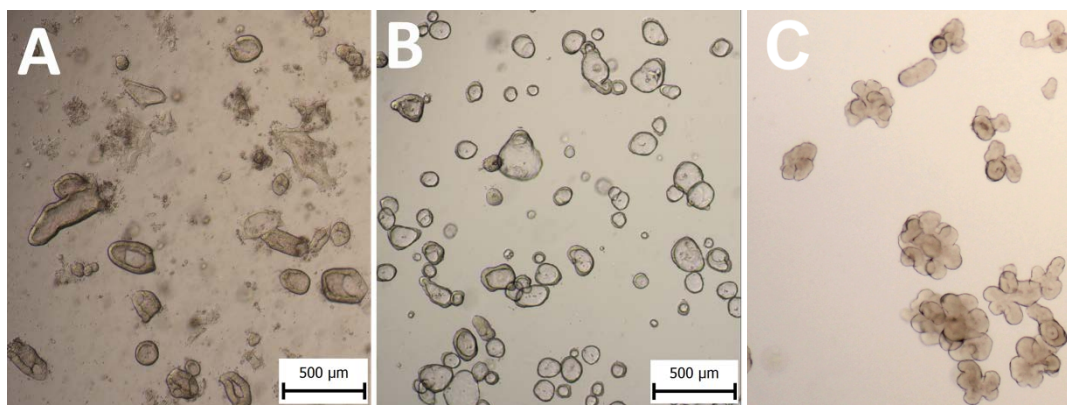
#### 1.7.2. Tkáňové kultury z nosních epiteliálních buněk

Lidské nosní epiteliální (HNE, human nasal epithelial) buňky se staly výhodnou alternativou bronchiálních kultur. Oproti HBE buňkám lze HNE buňky získat pomocí snadno dostupného stěru nosní sliznice. Podobnost morfologie a fyziologie HNE a HBE kultur umožňuje testování CFTR modulátorů i tkáňově specifické fyziologické studie. K elektrofyziologické analýze ALI kultur se využívá Ussingova komůrka jako u HBE kultur (Keegan & Brewington, 2021).

#### 1.7.3. Tkáňové kultury ze střevních buněk – intestinální organoidy

Primární intestinální organoidy jsou 3D kultury vytvořené ze zárodečných buněk přítomných v Lieberkühnových kryptách ve střevním 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 (obr. 4). 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.



**Obr. 4.** Intestinální organoidy. A) Lieberkühnovy krypty 1 den po izolaci z rektálních biopsií. B) Organoidy týden po úspěšné izolaci u zdravého jedince (WT-CFTR), jsoou patrná jasně utvořená lumen obklopená vrstvou buněk, neboť CFTR protein je funkční. C) Organoidy pacienta s CF a genotypem F508del/F508del, organoidy nemají viditelná lumen, neboť CFTR protein je dysfunkční. Jedná se o buňky vypěstované v naší laboratoři.

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 můžou 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).

#### 1.7.4. 3D kultury respiračního epitelu

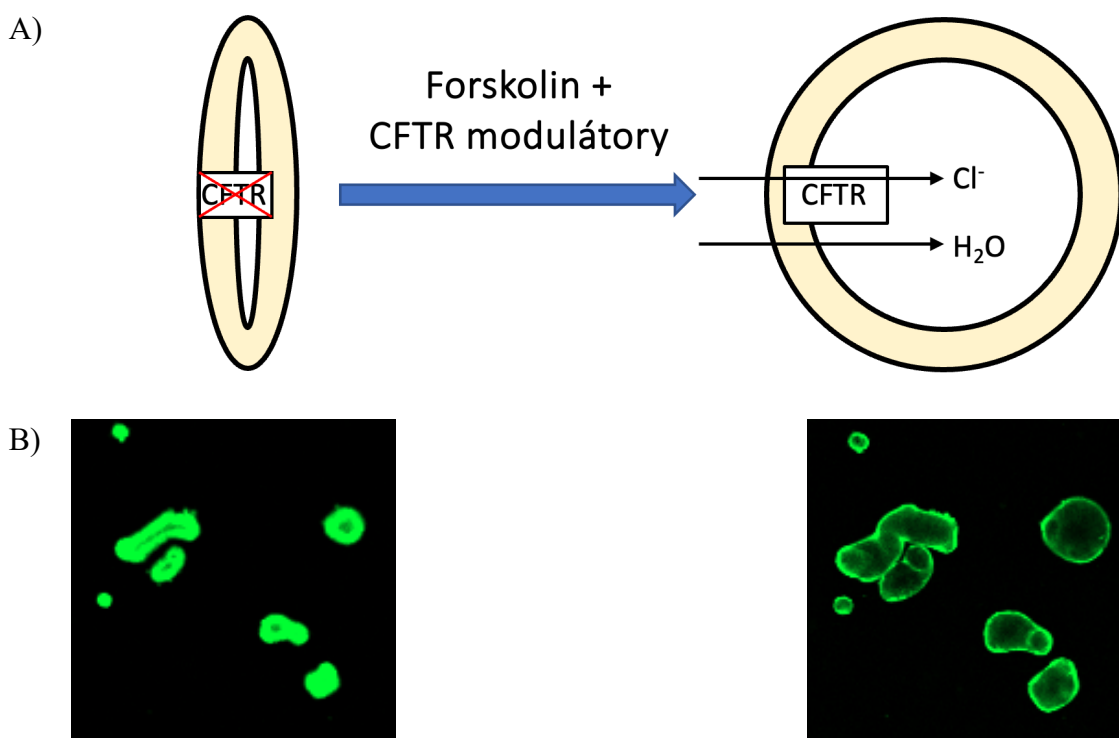
Za určitých podmínek se HBE / HNE kultury dají převést na 3D struktury (organoidy / sféroidy, nomenklatura není zcela ustálená), k tomu se recentně začaly využívat obdobné metody jako kultivace intestinálních organoidů, kdy se za specifických podmínek HNE / HBE buňky kultivují v extracelulární matrix (nejvyužívanější je Matrigel, Corning, USA), čímž dosáhneme organizace buněk do sférického útvaru, buňky jsou polarizované apikální membránou do centrálního lumen a mají charakteristiky respiračního epitelu (tvorba řasinek, hlenu) (Keegan & Brewington, 2021; Brewington *et al.*, 2018). Oproti ALI kulturám jsou 3D modely připravené k analýze za 1-2 týdny po prvotní expanzi (zhruba 2x rychleji než ALI kultury), ale u 3D kultur pozorována větší variabilita v kvalitě vzorku. Jedná se o poměrně novou výzkumnou metodu, není zatím k dispozici dostatek dat srovnávající 3D modely respiračního epitelu s již existujícími tkáňovými modely, a chybí i korelace s klinickými daty. Limitací je i nedostatek sdílených a standardizovaných protokolů k optimalizaci metody mezi laboratořemi a celková obtížnost kultivace respiračních organoidů (Brewington *et al.*, 2018).

#### 1.7.5. Funkční vyšetření intestinálních organoidů

Organoidový model se využívá ke zhodnocení funkce CFTR kanálu pomocí metody forskolinem indukované bobtnání (forskolin induced swelling assay, FIS). Forskolin je diterpen, který *in vitro* stimuluje adenylát cyklázu a tím zvyšuje hladinu cAMP v buňce. Vlastní cAMP jako druhý posel aktivuje proteinkinázu, která fosforyluje ATP na NBD, tím aktivuje CFTR kanál (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 organoidy s CFTR modulátory, můžeme pozorovat záchranu funkce iontového 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. Organoidy nabarvené kalceinovou zelení se analyzují fluorescenčním konfokálním mikroskopem s videozáznamem v reálném čase. Následně se ze změny objemu organoidu vypočítá aktivita CFTR kanálu (obr. 5).

Otázkou zůstává, zda pomocí *in vitro* vyšetření lze predikovat klinickou odpověď na CFTR modulátory. V roce 2016 Dekkers *et al.* publikovali práci popisující asociaci mezi výsledky FIS vyšetření a klinickou odpovědí na terapii (hodnoceno pomocí změn plicních

funkcí FEV1) (Dekkers *et al.*, 2016). 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. Nutno dodat, že FIS odpovědi a korelace s klinickými daty byly pozorovány pouze na malém vzorku pacientů, kteří se od sebe lišili *CFTR* genotypem. Další publikace stejné skupiny (Berkers *et al.*, 2019) se soustředila na soubor pacientů s plicními funkcemi FEV1 40–90 % a ukázala, že organoidový model správně predikoval klinicky významné zlepšení FEV1 a pokles hladiny chloridů v potu, ale znovu u velmi heterogenní skupiny pacientů.



**Obr. 5.** *Forskolinem indukované bobtnání. A) schematické zobrazení: organoid s dysfunkčním CFTR proteinem nemá viditelné lumen. Po inkubaci s CFTR modulátory a forskolinem následuje influx chloridových aniontů a vody do organoidu a vytvoření lumen. B) Příklad organoidů od pacienta s CF, nabarvené kalceinovou zelení, v nativním stavu (vlevo) a po inkubaci s CFTR modulátory a forskolinem (vpravo).*

## 1.8. Závěr

Z dostupné literatury je patrné, že buněčné modely CF, odvozené od pacienta, jsou široce využívány k hodnocení funkce CFTR kanálu a k hodnocení záchrany jeho funkce pomocí CFTR modulátorů. S ohledem na pozorovanou variabilitu na buněčných modelech (*in vitro*) a klinickou odpověď na CFTR modulátory (*in vivo*) je důležité prozkoumat rozsah a četnost této variability a ev. objasnit její důvody. Intestinální organoidy pacientů s CF a FIS vyšetření lze využít ke zhodnocení léčebné odpovědi u pacientů, kteří na podávanou léčbu neodpovídají standardně, ke zvolení nejvhodnějšího CFTR modulátoru (ve chvíli kdy máme k dispozici více léků) nebo může pomoci identifikovat respondenty na CFTR modulátory mezi pacienty se vzácnými mutacemi, kteří nemají možnost se zúčastnit klinických studií.

## 2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE

### 2.1. 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.

### 2.2. 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.

## 3 METODIKA

### 3.1. Výběr pacientů

Do studií byli zařazeni pacienti s cystickou fibrózou s různým *CFTR* genotypem, kteří byli ve sledování 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 byli zařazeni i zdravé kontroly. Všechny projekty byly schváleny etickou komisí příslušné organizace (FN Motol, University Hospital Leuven).

### 3.2. Odběr a kultivace intestinálních organoidů

Odběry vzorků rektální sliznice byly provedeny pomocí sukčního odběrového zařízení Rbi2 Suction Rectal Biopsy System (Aussystem, Austrálie), 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).

### 3.3. 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 CFTR korektor tezakaftor (3  $\mu$ M, Selleckchem, USA), (3) v médiu obsahující CFTR 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 CFTR korektor tezakaftor (3  $\mu\text{M}$ , Selleckchem, USA), (3) v médiu obsahující CFTR korektory elexakaftor (2  $\mu\text{M}$ , Selleckchem, USA) a tezakaftor (3  $\mu\text{M}$ ). 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  $\mu\text{M}$ , Selleckchem, USA) a ivakaftor (3  $\mu\text{M}$ , 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).

#### 3.4. 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 získány následující klinické parametry: plicní funkce vyjádřeny jako FEV<sub>1</sub>, nutriční stav vyjádřený jako BMI. Dále byla sledována koncentrace chloridů v potu před zahájením léčby a 6 měsíců na léčbě, celkový počet dnů na perorálních nebo intravenózních antibiotikách 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  $\mu\text{M}$  forskolinu).

### 3.5. 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 confirmaci základního genotypu a hledání dalších intragenických variant. Templátová DNA byla izolována ze žilní krve pomocí systému MagCore (RBC Bioscience; USA). 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 (Devyser.com; Švédsko). MPS (massive parallel sequencing) bylo provedeno na platformě MiSeq (Illumina.com, USA). 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, provedené systémem SALSA MLPA P091 *CFTR* (MRC Holandsko, Nizozemí) 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.

### 3.6. Hodnocení morfologie střevních organoidů

K hodnocení morfologie se využívají střevní organoidy pěstované dle postupu uvedeného v bodě 3.2., následně 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 ovalnost organoidů. K rozlišení mezi pacienty s CF a

zdravými kontrolami byla použita diskriminační analýza pomocí IR a CI. Podrobný protokol v publikaci 4.5.

### 3.7. Statistická analýza

Statistickou analýzu u každé z publikací prováděl zkušený statistik, podrobněji viz jednotlivé publikace 4.1., 4.2., 4.3. a 4.4.

## 4 KOMENTOVANÉ PUBLIKACE

- 4.1. Ramalho AS, Fürstová 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.

Pro tuto publikaci jsme vyšetřovali belgickou kohortu CF pacientů s různými *CFTR* genotypy. Pomocí FIS vyšetření střevních organoidů jsme analyzovali odpověď organoidů na *CFTR* modulátory (lumakaftor/ivakaftor, tezakaftor/ivakaftor, ivakaftor), a dále jsme zkoumali residuální funkci *CFTR* kanálu, tj. odpověď organoidů inkubovaných pouze s forskolinem, která vyjadřuje zbytkovou aktivitu *CFTR* kanálu. *In vitro* výsledky FIS (tj. AUC) jsme korelovali s klinickými daty získanými z literatury (jednalo se o data z klinických studií u pacientů s odpovídajícím *CFTR* genotypem). Cílem bylo zhodnotit střevní organoidy jako model personalizované medicíny u pacientu s CF.

Popsali jsme *in vitro* odpovědi na několik *CFTR* modulátorů u relativně rozsáhlé skupiny 97 pacientů s 28 různými *CFTR* genotypy. FIS odpověď na lumacaftor/ivakaftor byla variabilní mezi pacienty se stejným genotypem F508del/F508del. Pozorovali jsme celou škálu odpovědi od minimální až po vysokou. Zároveň *in vitro* odpověď byla srovnatelná v rámci triplicátů experimentu u jednoho pacienta.

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 prokázali efektivitu *CFTR* modulátorů *in vitro*.

Dva pacienti se vzácnými variantami získali léčbu na základě našich *in vitro* výsledků. Pacient s genotypem Q359K\_T360K/Q359K\_T360K byl nasazen na *CFTR* modulátor lumkaftor/ivakaftor, po 14 dnech od nasazení léku došlo ke zlepšení plicních funkcí (zlepšení FEV1 z 49 % na 65 %) a chloridy v potu se signifikantně snížily z 86 mmol/l

na 33 mmol/l. Druhý pacient s genotypem E60K/I507del byl nasazen na CFTR modulátor tezakaftor/ivakaftor, 6 týdnů od zahájení léčby došlo k vzestupu FEV1 z 32 % na 47 % a k poklesu chloridů v potu ze 73 mmol/l na 36 mmol/l.

V této studii jsme potvrdili, že hodnocení funkce CFTR pomocí střevních organoidů je proveditelné, přenosné a opakovatelné. Velikost záchrany funkce CFTR u organoidů s referenčním genotypem odpovídala výsledkům renomované laboratoře v Nizozemí (Dekkers *et al.*, 2014). 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). Zda lepší *in vitro* odpověď znamená lepší *in vivo* léčebnou odpověď musí být předmětem dalšího zkoumání. U několika vzácných mutací jsme nově prokázali *in vitro* efektivitu CFTR modulátorů a využili tuto metodu u dvou pacientů v klinické praxi. Celkově naše výsledky ukázaly, že studium funkce CFTR proteinu a její záchrany na střevních organoidech otevírá cestu k personalizované terapii, což je relevantní zejména pro pacienty se vzácnými mutacemi, kteří nejsou běžně zařazeni do klinických studií.



# Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis

Anabela S. Ramalho<sup>1</sup>, Eva Fürstová<sup>2</sup>, Annelotte M. Vonk<sup>3,4</sup>, Marc Ferrante<sup>5,6</sup>, Catherine Verfaillie<sup>7</sup>, Lieven Dupont<sup>8,9</sup>, Mieke Boon<sup>1,10</sup>, Marijke Proesmans<sup>1,10</sup>, Jeffrey M. Beekman<sup>3,4</sup>, Ifat Sarouk<sup>11</sup>, Carlos Vazquez Cordero<sup>12</sup>, Francois Vermeulen<sup>1,10</sup> and Kris De Boeck<sup>1,10</sup> on behalf of the Belgian Organoid Project<sup>13</sup>

 @ERSpublications

**Rescue of CFTR function with modulators measured in colon organoids can be used to guide precision medicine in patients with cystic fibrosis. Organoids are an effective model to bring treatment to patients with CF carrying rare CFTR mutations.** <https://bit.ly/2VHHH6s>

**Cite this article as:** Ramalho AS, Fürstová E, Vonk AM, *et al.* Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2021; 57: 1902426 [<https://doi.org/10.1183/13993003.02426-2019>].

## ABSTRACT

**Rationale:** Given the vast number of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) mutations, biomarkers predicting benefit from *CFTR* modulator therapies are needed for subjects with cystic fibrosis (CF).

**Objectives:** To study *CFTR* function in organoids of subjects with common and rare *CFTR* mutations and evaluate correlations between *CFTR* function and clinical data.

**Methods:** Intestinal organoids were grown from rectal biopsies in a cohort of 97 subjects with CF. Residual *CFTR* function was measured by quantifying organoid swelling induced by forskolin and response to modulators by quantifying organoid swelling induced by *CFTR* correctors, potentiator and their combination. Organoid data were correlated with clinical data from the literature.

**Results:** Across 28 genotypes, residual *CFTR* function correlated ( $r^2=0.87$ ) with sweat chloride values. When studying the same genotypes, *CFTR* function rescue by *CFTR* modulators in organoids correlated tightly with mean improvement in lung function ( $r^2=0.90$ ) and sweat chloride ( $r^2=0.95$ ) reported in clinical trials. We identified candidate genotypes for modulator therapy, such as E92K, Q237E, R334W and L159S. Based on organoid results, two subjects started modulator treatment: one homozygous for complex allele Q359K\_T360K, and the second with mutation E60K. Both subjects had major clinical benefit.

**Conclusions:** Measurements of residual *CFTR* function and rescue of function by *CFTR* modulators in intestinal organoids correlate closely with clinical data. Our results for reference genotypes concur with previous results. *CFTR* function measured in organoids can be used to guide precision medicine in patients with CF, positioning organoids as a potential *in vitro* model to bring treatment to patients carrying rare *CFTR* mutations.

This article has supplementary material available from [erj.ersjournals.com](http://erj.ersjournals.com)

Received: 17 Dec 2019 | Accepted after revision: 29 June 2020

Copyright ©ERS 2021

## Introduction

Cystic fibrosis (CF) is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene coding for the CFTR protein which functions as an anion channel. More than 2000 *CFTR* mutations have been reported [1]. Only mutation F508del, occurring on 70% of CF alleles, is frequent. In the European CF patient registry [2], only five mutations have a frequency >1%. Many mutations are ultra-rare, occurring in just a few patients. In the CFTR2 project 412 mutations have been characterised so far [3].

Four *CFTR* modulators targeting the *CFTR* protein defect have been approved to treat patients: the correctors lumacaftor, tezacaftor and elexacaftor improve intracellular *CFTR* trafficking; the potentiator ivacaftor increases *CFTR* function. Corrector-rescued F508del-*CFTR* has impaired gating and requires a potentiator to optimise ion transport. The combination of one corrector plus potentiator results in modest clinical benefit for patients homozygous for F508del [4], while the combination of tezacaftor, elexacaftor and ivacaftor improved outcome in patients with one [5] or two F508del mutations [6]. Treatment with the potentiator ivacaftor brings major benefit for subjects with a class III mutation [7, 8], and modest benefit to subjects with a selected list of residual function mutations [9]. For a review of this rapidly expanding area we refer to CUYX and DE BOECK [10].

At present, most patients with rare *CFTR* mutations have no *CFTR*-directed treatment. Their small number is a hurdle for conclusive clinical trials. For these patients, the development of organoids as a biomarker of *CFTR* function and its rescue by *CFTR* modulators is a major breakthrough [11, 12]. Although the culture conditions and techniques to grow organoids are complex, access to subject's rectal tissue *via* suction biopsies is easy. The procedure is painless and does not require local anaesthesia. Organoids can be expanded over long time periods and biobanked [13]. In the context of CF, *CFTR* residual function and its rescue by *CFTR* modulators can be quantified by the forskolin-induced swelling (FIS) assay [11, 14]. Mean improvements seen in the different clinical trials correlate with *CFTR* rescue assessed *via* the FIS assay in organoids of subjects with the trialled mutations [14]. In addition, organoid responses in subjects with ultra-rare mutations have predicted clinical benefit [14]. Results so far support that organoids can be used to guide personalised medicine [15].

We established a biobank of intestinal organoids of subjects with CF at the CF research lab of the University of Leuven (Belgium). Our aims were to assess the portability and robustness of the CF organoid model by confirming FIS assay results obtained in subjects with common mutations by others and to expand knowledge on organoid use in patients with rare *CFTR* mutations.

## Materials and methods

### *Subjects, rectal biopsies and mutations*

This study was approved by the ethics review board of the University Hospitals Leuven. All patients/parents gave written informed consent and/or assent. Rectal mucosa tissue was obtained by suction biopsy during a routine clinic visit. The biopsies were stored in ice-cold phosphate buffer and kept on ice until crypt isolation. In this cohort, no major adverse events were reported.

We recruited 97 subjects (supplementary figure S1) with CF [16], with well characterised mutations (F508del, S1251N, R117H and G542X) and with rare *CFTR* mutations, including mutations not yet characterised in the CFTR2 project [3]. Clinical data retrieved from medical files are summarised in table 1 and supplementary tables S1 and S2.

### *Isolation of crypts, culturing of organoids and FIS assay*

For detailed methods refer to VONK *et al.* [17] and the supplementary materials. Crypts were isolated from the rectal biopsies and subsequently mixed with 50% matrigel and plated on 24-well plates; medium was

---

**Affiliations:** <sup>1</sup>Dept of Development and Regeneration, Woman and Child Unit, CF Research Lab, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>2</sup>Dept of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Dept of Pediatric Pulmonology, Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands. <sup>4</sup>Regenerative Medicine Center, University Medical Centre, Utrecht, The Netherlands. <sup>5</sup>Dept of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing, Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>6</sup>Dept of Gastroenterology and Hepatology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. <sup>7</sup>Dept of Development and Regeneration, Stem Cell Biology and Embryology, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>8</sup>Dept of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing; Pneumology, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>9</sup>Dept of Respiratory Diseases, University Hospital of Leuven, Leuven, Belgium. <sup>10</sup>Dept of Pediatrics, Pediatric Pulmonology, University Hospital of Leuven, Leuven, Belgium. <sup>11</sup>Pulmonology Pediatrics and National CF Center Edmond and Lily Safra Children's Hospital, Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel. <sup>12</sup>Pulmonology and Cystic Fibrosis Unit, Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain. <sup>13</sup>A list of members of the Belgian Organoid Project can be found in the acknowledgements section.

**Correspondence:** Anabela S. Ramalho, O&N IV – 5th floor – bus 804, Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium. E-mail: anabela.ramalho@kuleuven.be



TABLE 1 Baseline characteristics of subjects from whom the rectal organoids are included in the study with lumacaftor and ivacaftor

	Subjects	Sex	Age years	Age at diagnosis years	Sweat [Cl <sup>-</sup> ] mmol·L <sup>-1</sup>	PS/PI	FEV <sub>1</sub> % predicted	CFTR1 info	CFTR2 info (reported)
<b>Reference genotypes</b>									
F508del/F508del	35	M 22, F 13	9 (1–46)	0.2 <sup>#</sup> [0–7.5]	102 <sup>¶</sup> [86.5–119]	PI	76 <sup>*</sup> [28–137]	Yes	CF-causing (n=33 983)
F508del/S1251N	4	M 2, F 2	22 [12–37]	0.7 [0.1–0.8]	94 [83–98]	PI 3, PS 1	75 [52–107]	Yes	CF-causing (n=92)
F508del/R117H	2	M	(19, 27)	[11.5, 19.7]	43, 61	PS	117–111	Yes	Variable consequences (n=1309)
G542X/G542X	1	F	41	1.6	117	PI	94	Yes	CF-causing (n=121)
<b>F508del heterozygous</b>									
F508del/MF (F508del/N1303K n=4, F508del/G542X n=3, F508del/4010del4 n=1, F508del/1898+1G>C n=1, F508del/1259insA n=1, F508del/1717–1G>A n=1)	11	M 3, F 8	12 [5–43]	0.3 <sup>§</sup> [0–10.1]	101 <sup>§</sup> [90–121]	PI	82 <sup>f</sup> [30–102]	Yes	All CF-causing, F508del/N1303K (n=1240), F508del/G542X (n=2112), F508del/4010del4 (n=5), F508del/1898+1G>C (n=292), F508del/1259insA (n=7) and F508del/1717–1G>A (n=800)
F508del/R117C	1	M	5	3.5	46.5	PS	ND	Yes	CF-causing (n=91)
F508del/L159S	2	F	(18, 20)	(4.7, 6.6)	76, 54	PS	113	Yes	L159S not reported
F508del/Q237E	1	M	48	39.1	80	PS	64	Yes	Q237E not reported
F508del/R334W	1	M	59	19.4	ND	PI	37	Yes	CF-causing (n=231)
F508del/A455E	1	F	10	0.2	88	PI	95	Yes	CF-causing (n=355)
F508del/D1152H	1	M	57	44.6	44	PS	38	Yes	Variable consequences (n=358)
F508del/TG12T5	1	M	14	2.9	40	PS	87	Yes	Variable consequences (n=95)
F508del/3849+10kbC>T	1	F	31	8.2	ND	PS	38	Yes	CF-causing (n=651)

Continued



TABLE 1 Continued

	Subjects	Sex	Age years	Age at diagnosis years	Sweat [Cl <sup>-</sup> ] mmol·L <sup>-1</sup>	PS/PI	FEV <sub>1</sub> % predicted	CFTR1 info	CFTR2 info (reported)
<b>Non-F508del</b>									
Q359K_T360K/ Q359K_T360K	1	F	40	ND	90	ND	ND	Yes	Not reported
A455E/del Ex1 and promoter	1	M	52	27.9	98	PS	65	Yes	del ex1 and promoter not reported, A445E CF-causing (n=499)
E831X/E831X	1	F	2	0.3	54	PS	ND	Yes	CF-causing (n=2)
W1282X/G85E	1	M	34	0.4	114	PI	56	Yes	CF-causing (n=10)
W1282X/I1234V	2	M 1, F 1	[26, 31]	ND	79, 115	ND	ND	Yes	CF-causing (n=9)
W1282X/TG12T5	2	M 1, F 1	[10, 13]	ND	30, 52	ND	ND	Yes	Combination not reported, W1282X CF-causing (n=1556), TG12T5 variable
N1303K/Q359K_T360K	1	F	18	ND	117	ND	ND	Yes	Combination not reported, N1303K CF-causing (n=2147), Q359K_T360K not reported
N1303K/K464E	1	F	13	0.3	110	PI	111	K464E not reported	Combination not reported, N1303K CF-causing (n=2147), K464E not reported
N1303K/3121-1G>A	1	M	13	ND	100	PI	ND	Yes	CF-causing (n=1)
N1303K/4010del4	1	F	23	ND	ND	ND	ND	Yes	CF-causing (n=1)
405+1G>A/405+1G>A	1	M	27	ND	105	ND	ND	Yes	CF-causing (n=2)
c.1648_1652dupATCAT/M1137R	1	M	11	0.2	102	PS	94	c.1648_1652dupATCAT not reported	Both not reported
1717-1G>A/ g.3464_3471dupTCATTGCT and V1198M	1	F	16	0.9	106	PI	77	g.3464_3471dupTCATTGCT and V1198M not reported	g.3464_3471dupTCATTGCT and V1198M not reported, 1717-1G>A CF-causing (n=1202)
1811+1.6kbA>G/E92K	1	F	6	0.4	77	PI	96	Yes	Combination not found, both CF-causing, E92K (n=42), 1811+1.6kbA>G (n=22)
4218insT/3272-26A>G	1	M	40	0.1	84	PI	81	Yes	CF-causing (n=1)

Data are presented as n or median [range], unless otherwise stated. PS: pancreatic sufficient; PI: pancreatic insufficient; FEV<sub>1</sub>: forced expiratory volume in 1 s; CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; M: male; F: female; CF: cystic fibrosis; ND: not determined. #: n=33; ¶: n=32; \*: n=24; §: n=10; †: n=8.

added after the solidification of matrigel, as described previously [11]. The growth medium was changed every other day. The organoids were split by mechanical disruption after every 7 days in culture. Organoids were produced successfully from 87% of the biopsies.

CFTR activity in the organoids was quantified using the FIS assay as described previously [11, 17]. In short, organoids (between 4th and 20th passage) were seeded in 96-well plates (Greiner, Kremsmünster, Austria) in 4- $\mu$ L matrigel drops containing 15–60 organoids covered with 50  $\mu$ L of growth medium. The following day, calcein green (Invitrogen, Waltham, MA, USA) was added for staining. Subsequently, to stimulate CFTR, eight dilutions of forskolin from 0.008 to 5  $\mu$ M were added and the organoids were immediately analysed by confocal live-cell microscopy (LSM800, 5 $\times$  objective; Zeiss, Oberkochen, Germany). Every 10 min (from 0 to 60 min ( $t_0$ – $t_{60}$ )), the total organoid area (xy plane) was automatically quantified using Zen blue analysis software (Zeiss), and normalised to the area at  $t_0$ . To test rescue of CFTR function by correctors, organoids were pre-incubated overnight with 3  $\mu$ M lumacaftor (VX-809; Selleckchem, Munich, Germany). Ivacaftor at a concentration of 3  $\mu$ M (VX-770; Selleckchem) was added as a potentiator in combination with forskolin. Within each organoid experiment, every test condition was assessed in duplicate. Per organoid donor, three independent experiments were performed on different days. Values reported correspond to the average area under the curve (AUC) calculated from plots representing the mean percentage of organoids swelling from  $t_0$  to  $t_{60}$  (60 min) and standard error of the mean of the three independent experiments (supplementary data and figure S2).

Residual CFTR function was determined from the organoid swelling after addition of forskolin alone. Rescue of CFTR function by CFTR modulator(s) was determined by the increase in AUC after stimulation with forskolin plus modulator(s) subtracting the increase after addition of forskolin alone.

### Statistics

SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA) or GraphPad (San Diego, CA, USA) were used for figures and statistical analysis. For correlations, Pearson correlation coefficients were calculated. A general linear model including subject, day of testing and their interaction was used for the variance component analysis of the response to modulators.

## Results

### *The effect of lumacaftor and ivacaftor in organoids from subjects with mutations with known responses to CFTR modulators*

FIS assays were performed in organoids from subjects with the following reference genotypes: F508del/S1251N (n=4; S1251N, the most common class III mutation in Belgium); F508del/R117H (n=2; R117H, a class IV mutation); F508del/F508del (n=35; a class II mutation); G542X/G542X (n=1; a class I mutation). In F508del/S1251N and F508del/R117H organoids, maximal FIS was obtained after activation of CFTR by ivacaftor (figure 1a), without additive effect from lumacaftor. F508del/R117H organoids showed a high residual CFTR function, as evidenced by the marked FIS without exposure to modulators. In F508del/F508del organoids, a modest FIS was seen after exposure to the combination of ivacaftor–lumacaftor. G542X/G542X organoids showed no response to CFTR modulators and no residual function. Figure 1b shows representative images of the swelling after 1 h compared to baseline.

### *Correlating clinical trial results to organoid results*

To isolate the drug effect from the residual CFTR function we subtracted the AUC with forskolin alone from the AUC with forskolin plus modulators. The mean improvements in forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) and sweat chloride from published clinical trials [4, 8, 9, 18–22] correlated closely with the mean FIS modulator responses seen in organoids from subjects with the same mutations as those in these trials (figure 2b and c). The best correlations were found at a forskolin concentration of 0.8  $\mu$ M:  $r^2=0.90$  between the responses in organoids and the mean changes in FEV<sub>1</sub> (figure 2b), and  $r^2=0.95$  between the responses in organoids and the mean changes in sweat chloride (figure 2c). Correlations at forskolin concentrations of 0.32  $\mu$ M were in the same range (supplementary figure S3).

### *Between- and within-subject differences in modulator responses for reference genotypes*

FIS responses to the combination lumacaftor–ivacaftor in organoids from 35 F508del/F508del subjects ranged from very low, close to the absent response in the G542X homozygous subject, to as high as those seen with ivacaftor in F508del/S1251N organoids (figure 3a). Subtraction of the forskolin effect had the most profound influence on the results from the R117H organoids (figure 3b).

The within-subject repeatability of the FIS response to modulators is shown in figure 3c: a high responder repeatedly is a high responder; a low responder repeatedly is a low responder, even within the group of

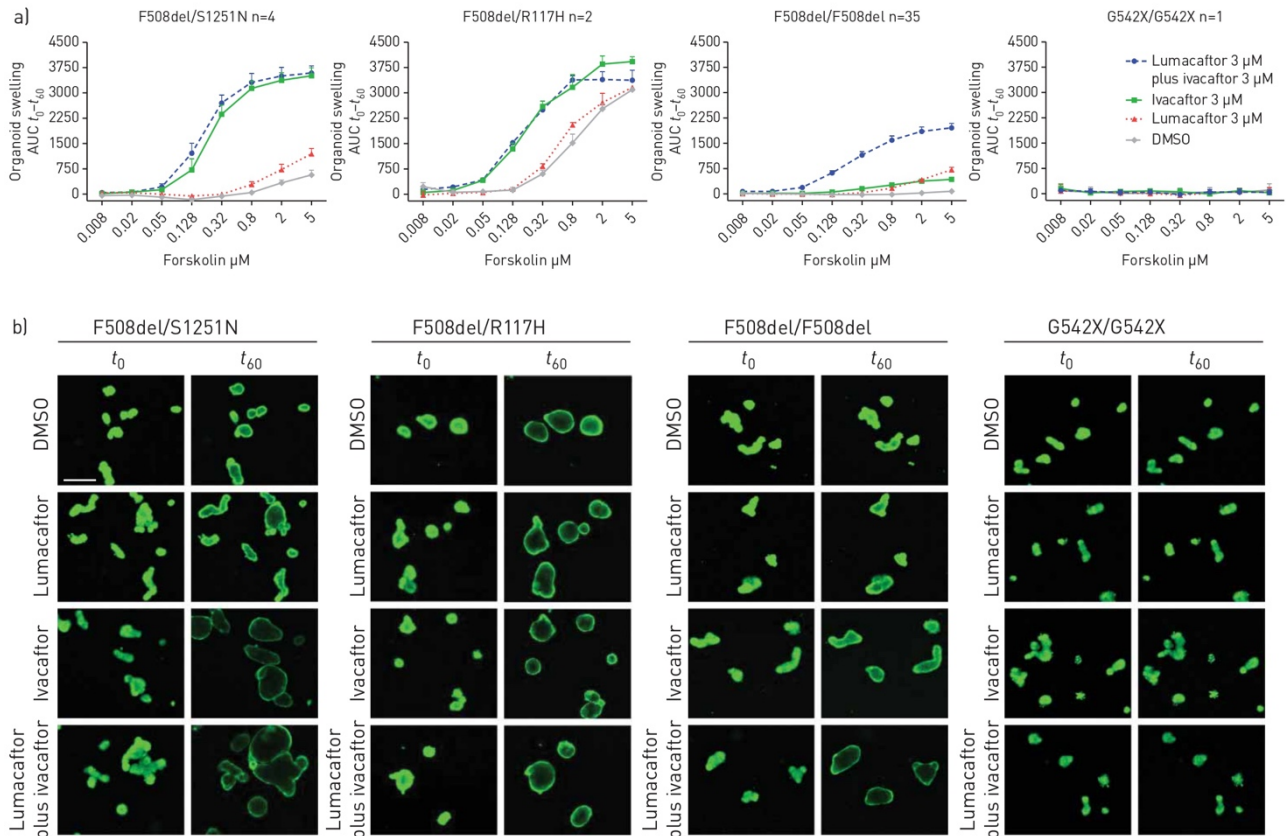


FIGURE 1 Forskolin-induced swelling (FIS) assay in the organoids from patients with reference genotypes. a) Organoids were incubated overnight with lumacaftor (VX-809 3  $\mu\text{M}$ ). Stimulation with forskolin (increasing concentrations from 0.008 to 5  $\mu\text{M}$ ) was done after 24 h, either alone or in combination with ivacaftor (VX-770 3  $\mu\text{M}$ ) over 1 h. Each condition was tested in duplicate on three different days. Values plotted are the average and SEM of the area under the curve (AUC); b) representative images of the organoids at baseline ( $t_0$ ) and after stimulation for 1 h ( $t_{60}$ ) with forskolin without dimethyl sulfoxide (DMSO) and with modulators. Scale bar=200  $\mu\text{m}$ .

F508del homozygous subjects ( $p < 0.001$ ). Variability in the response is mainly between subjects (68%), rather than between tests (24%) or within test (8%).

#### *Residual CFTR function measured in organoids in vitro correlates with sweat chloride measured in vivo*

In 74 subjects with 28 different genotypes we found an excellent semi-logarithmic correlation ( $r^2 = 0.87$ ) between the mean sweat chloride per genotype and the mean residual CFTR function for each genotype assessed in organoids (figure 4a). For five subjects, sweat test results were not available.

Figure 4b(i) displays residual CFTR function (FIS responses at 0.8  $\mu\text{M}$  forskolin) in organoids from the 79 subjects with the 33 different genotypes studied (table 1). Figure 4b(ii) represents the sweat chloride per genotype (with median and ranges reported in table 1). Organoids with the highest residual function were from subjects with the lowest sweat chloride, the majority having values below the diagnostic threshold of 60  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (figure 4b). Correlation was also observed with pancreatic status and age at diagnosis (supplementary table S1). No correlation was found between the mean  $\text{FEV}_1$  % predicted and the mean residual CFTR function (figure 4c and supplementary table S1).

#### *Organoid swelling induced by CFTR modulators in subjects with rare CFTR mutations and F508del/minimal function mutations*

FIS responses to CFTR modulators in organoids from 26 subjects with 23 different rare mutations and from 11 subjects heterozygous for F508del and a known minimal function mutation are shown in figure 5. The responses in the four reference genotypes are displayed for comparison. The organoid swelling results induced by ivacaftor, lumacaftor and ivacaftor-lumacaftor combination (after subtracting the contribution of forskolin) are ranked from highest to lowest responders.



a)		Absolute change from baseline in FEV <sub>1</sub> % predicted versus placebo	Absolute change from baseline in sweat chloride mmol·L <sup>-1</sup>	Organoid swelling AUC at 0.8 μM Fsk plus modulators minus response 0.8 μM Fsk alone	SEM	References
1) VX-770	S1251N n=4	8.7	-54	3085	220	[8]
2) VX-770	R117H n=2	5.0	-24	1646	369	[9]
3) VX-809+ VX-770	F508del/F508del n=35	3.3	-21	1607	126	[4 <sup>#</sup> , 22 <sup>¶</sup> ]
4) VX-809+ VX-770	F508del/MF n=10	0.6	-11	833	82	[19]
5) VX-770	F508del/F508del n=35	1.7	-3	282	40	[20]
6) VX-809	F508del/F508del n=35	0.5	-8	172	29	[21]

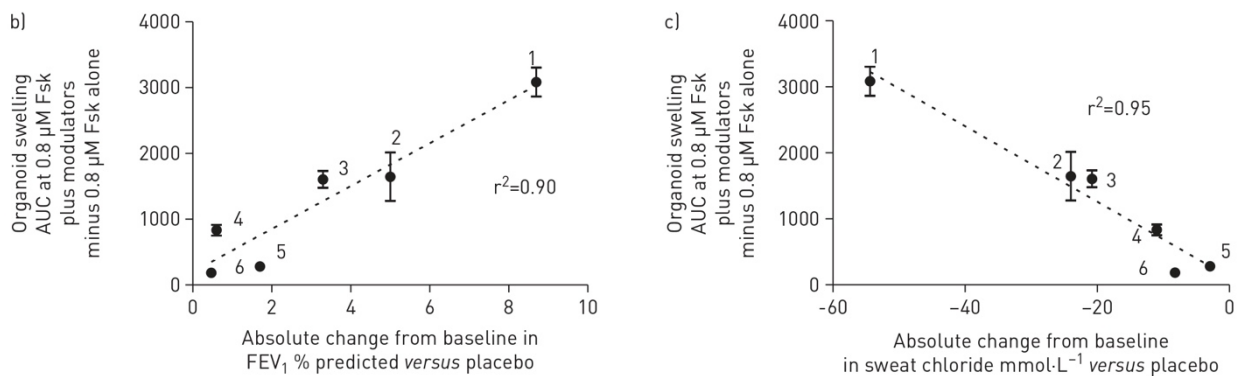


FIGURE 2 Correlation between responses to modulators *in vitro* in the forskolin (Fsk)-induced swelling assay and *in vivo* from published clinical trials. a) Responses to lumacaftor (VX-809) and/or ivacaftor (VX-770) in organoids with the F508del/F508del, F508del/S1251N, F508del/R117H and F508del/minimal function (MF) were compared to the clinical responses (forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) and sweat chloride) obtained in published clinical trials with patients having the same genotypes; b) correlation between the absolute change in FEV<sub>1</sub> in clinical trials and the organoid responses in our cohort at 0.8 μM forskolin with the same modulators; c) correlation between the absolute change in sweat chloride in clinical trials and the organoid responses in our cohort at 0.8 μM forskolin with the same modulators. AUC: area under the curve. <sup>#</sup>: reference for FEV<sub>1</sub> value; <sup>¶</sup>: reference for sweat chloride value.

There was no correlation between residual function and response to CFTR modulators ( $p=0.96$ ). The organoid response was higher than the average response to the combination lumacaftor–ivacaftor in F508del/F508del organoids for subjects with the E92K mutation and with the very rare mutations Q237E and Q359K\_T360K. Responses similar to those in F508del homozygous organoids were seen for L159S (not explored in CFTR2) and for R334W.

For most genotypes, the swelling induced in organoids was higher with the combination ivacaftor–lumacaftor than with either drug alone. Only for mutations Q237E, D1152H, 3849+10 kb(C>T) and R117C the response to ivacaftor equalled the response to the combination. E92K shows the particularity that CFTR function is mainly rescued by lumacaftor, with only a slight further increase on addition of ivacaftor (figure 5).

Very high residual CFTR function, but low additional responses to modulators were observed for mutation T5, classified as “of varying clinical consequence” in the CFTR2 database.

Residual CFTR function was absent in all organoids with genotypes F508del/minimal function, and at best low responses to lumacaftor plus ivacaftor were found.

Almost no response to modulators was observed in I1234V/W1282X organoids. For two mutations (g.3464\_3471dupTCATTGCT\_V1198M and K464E), not reported in CFTR1 nor in CFTR2, there was no swelling observed with the CFTR modulators tested.

#### Informing precision medicine: two examples

A 38-year-old pancreatic-insufficient man with CF, homozygous for complex allele Q359K\_T360K, received a donation for 1-month Orkambi<sup>TM</sup> (combination ivacaftor–lumacaftor) treatment based on the organoid response (supplementary figure S4). 2 weeks after starting treatment his FEV<sub>1</sub> rose from 49% to 65%, sweat conductivity decreased from 86 to 33 mmol·L<sup>-1</sup> and he gained 1.8 kg.

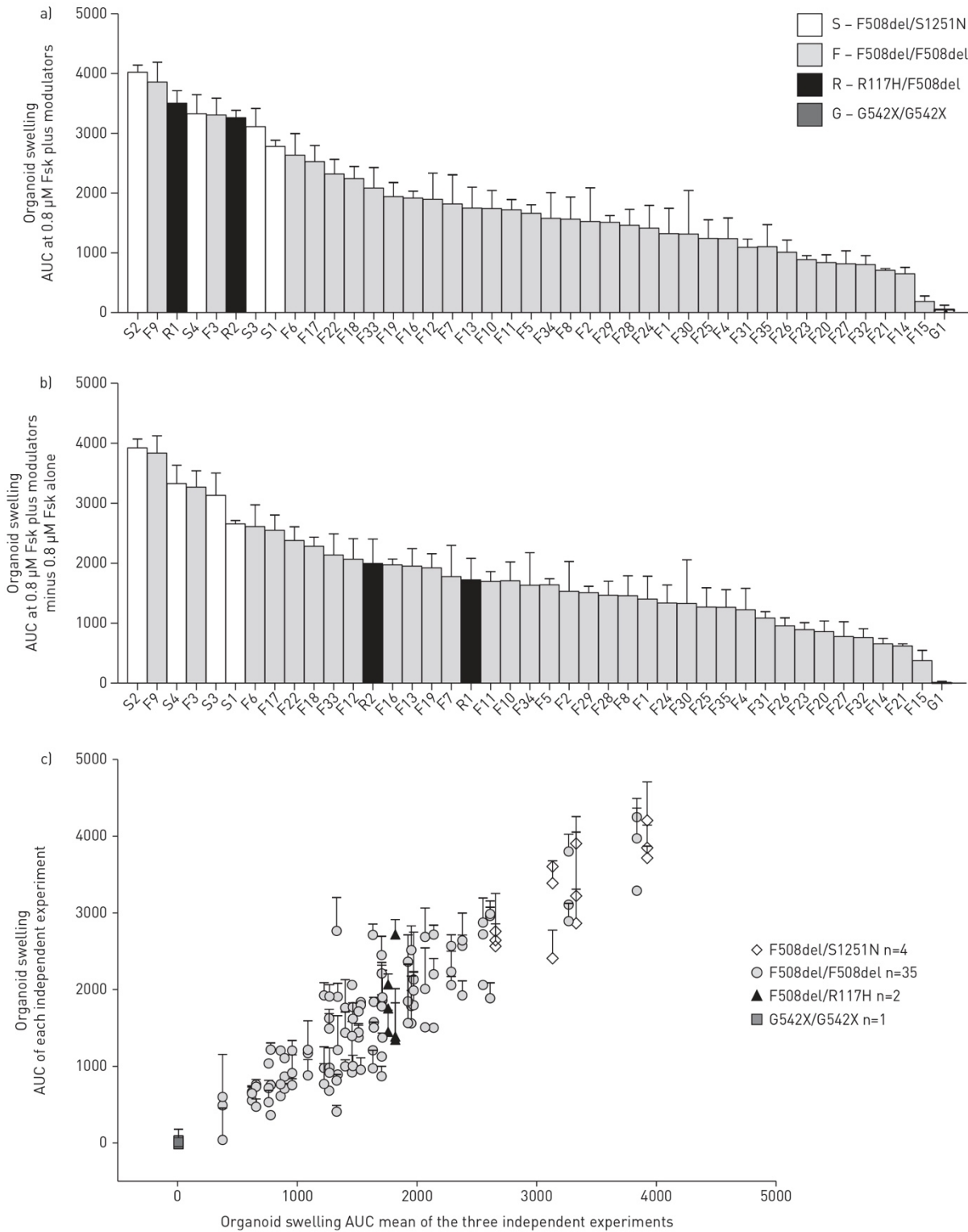


FIGURE 3 Between- and within-subject variability of forskolin (Fsk)-induced swelling in organoids of 42 patients with the reference genotypes. a) Organoid swelling (area under the curve [AUC]) with lumacaftor and ivacaftor at 0.8 μM forskolin (without correction for the response to forskolin alone). Data are presented as mean±SEM for the three experiments per subject; b) same as a) after subtraction of the swelling (AUC) induced by forskolin alone; c) AUC at 0.8 μM forskolin for the combination of lumacaftor plus ivacaftor (corrected for the AUC at 0.8 μM forskolin without modulators) obtained in each of the three individual experiments on different days (y-axis), according to the mean AUC of the three experiments (x-axis). Error bars represent standard deviation of the two replicates within each experiment.

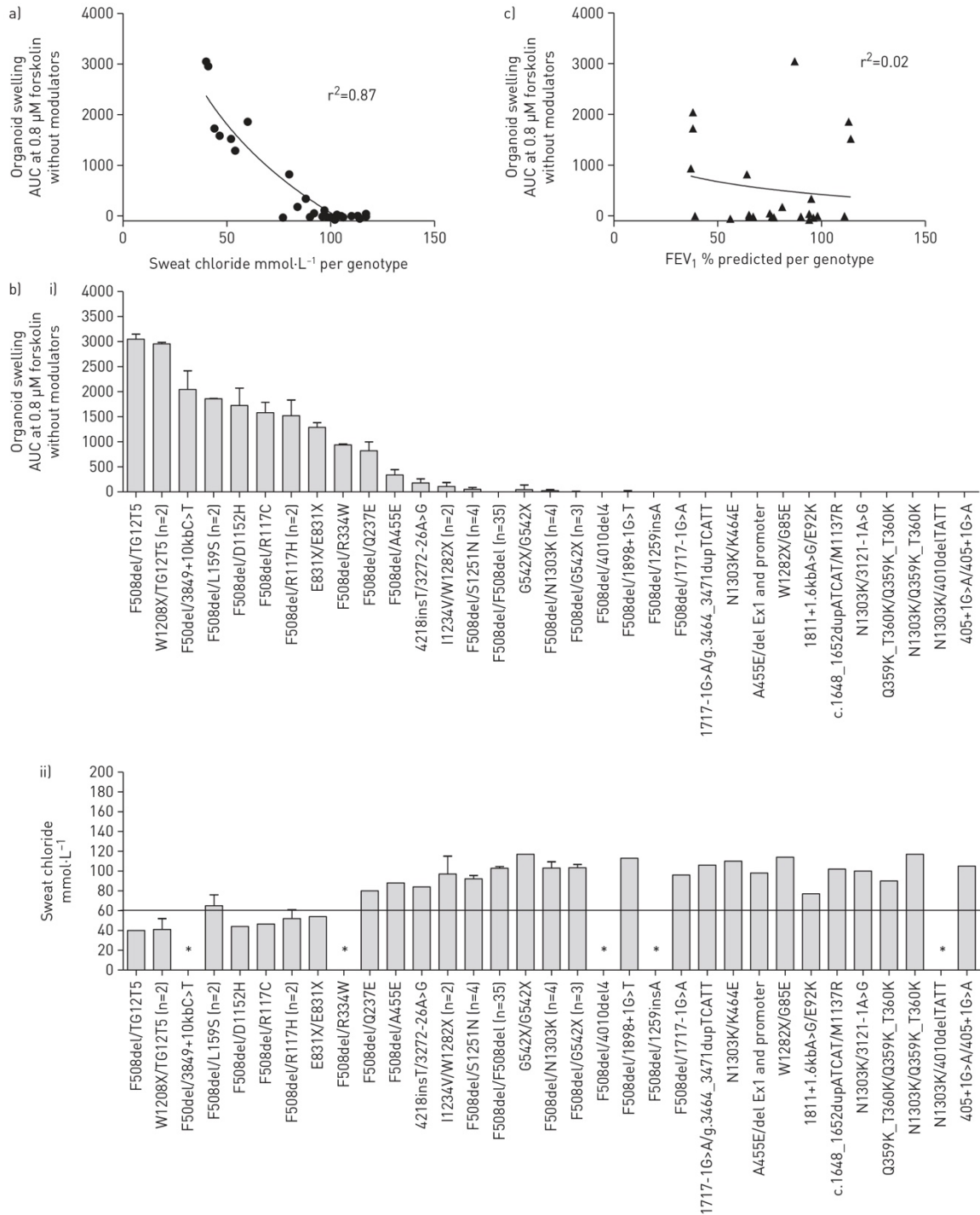


FIGURE 4 Correlation between residual cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) function and sweat chloride. a) Correlation between residual CFTR function measured in organoids after stimulation with 0.8  $\mu\text{M}$  forskolin alone and sweat chloride from subjects with the same genotype (mean values per genotype). Sweat chloride was missing for five different genotypes; b) i) residual CFTR function (mean and standard error of the area under the curve [AUC] at 0.8  $\mu\text{M}$  forskolin without modulators) in organoids from 33 different genotypes (79 subjects) (table 1). Genotypes are ordered from high to low residual CFTR function; ii) the sweat chloride for the same genotypes (individual value or mean $\pm$ SD). Ranges of sweat chloride per genotype are reported in table 1. The horizontal line represents the diagnostic cut-off for cystic fibrosis (60 mmol·L<sup>-1</sup>). Error bars represent SEM of the three experiments (n=1) or the SEM of the different subjects (n>1). n=1 unless stated otherwise; c) correlation between residual CFTR function measured in organoids after stimulation with 0.8  $\mu\text{M}$  forskolin alone and forced expiratory volume in 1 s (FEV<sub>1</sub>) % predicted from subjects with the same genotype (mean values per genotype). FEV<sub>1</sub> % predicted was missing for 25 subjects with 10 different genotypes.

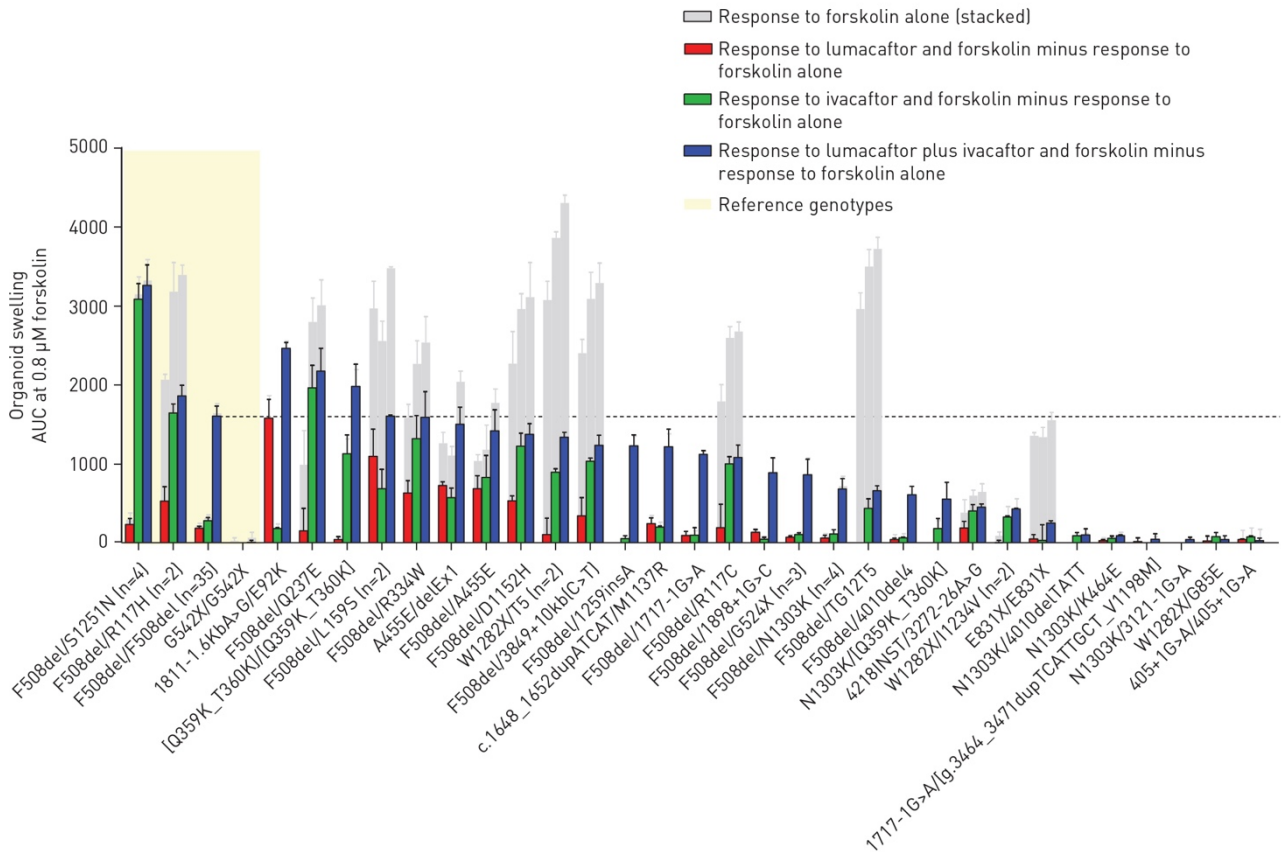


FIGURE 5 Response to modulator(s) at 0.8  $\mu\text{M}$  forskolin corrected for the residual function (response to forskolin alone), with the residual function stacked on top of the response to modulator(s). The four reference genotypes are ordered by the (mean) response to lumacaftor plus ivacaftor. The horizontal line corresponds to the mean response to lumacaftor plus ivacaftor in the organoids of the 35 F508del/F508del subjects. Error bars represent the SEM of the three experiments ( $n=1$ ) or the SEM of the different subjects ( $n>1$ ). Characteristics of the subjects are described in table 1.  $n=1$  unless stated otherwise.

A high response to modulators was found in organoids from a subject with the E60K/I507del genotype (supplementary figure S4 and table S2), convincing the health authorities to approve treatment with Symkevi<sup>TM</sup> (combination tezacaftor–ivacaftor). 6 weeks after starting Symkevi<sup>TM</sup>, sweat chloride improved from 73 to 36  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{FEV}_1$  increased from 32% to 47%, and CFQ- $R_{\text{resp}}$  (a CF-specific quality-of-life score to a maximum of 100 and a minimal clinically important difference of 4) rose from 24 to 78.

## Discussion

We confirm and expand on previous findings by other labs in organoids from subjects with CF [11, 12, 14, 23], showing that assessment of CFTR function in intestinal organoids is feasible, portable and repeatable, as these new results were obtained in a cohort of unique subjects, in a different lab by different researchers.

The magnitude of organoid responses seen in the reference genotypes is in line with those reported by DEKKERS *et al.* [14]. In addition, we found a correlation between the mean clinical benefit from modulators in clinical trials and the mean rescue of CFTR function measured in organoids from subjects with the same mutations. However, the correlation with clinical trial data reported here is stronger than reported previously. By only taking into account the modulator response rather than the modulator plus forskolin response, we “correct” for the high residual function seen in some organoids, mainly R117H. The closer correlation with clinical trial data in this paper ( $r^2=0.90$  for changes in  $\text{FEV}_1$ ) compared to DEKKERS *et al.* ( $r^2=0.76$ ) [14] might also be related to larger numbers in the present study.

The within-subject repeatability of the FIS assay was acceptable, and much smaller than the between-subject variability. Organoid responses vary between subjects even within the same genotype. This mimics findings in the lumacaftor plus ivacaftor clinical trial in patients homozygous for F508del: the



waterfall plot of improvement in FEV<sub>1</sub> shows large benefits in some subjects and hardly any in others [4]. Whether subjects whose response to modulators in organoids is higher than others with the same genotype can also be expected to have a better clinical response is still to be investigated.

In subjects with 28 different genotypes, we showed an excellent ( $r^2=0.87$ ) nonlinear correlation between sweat chloride and residual CFTR function assessed in organoids. Others also found correlations between *in vivo* and *in vitro* biomarkers of CFTR function, including sweat chloride concentration, CFTR mediated chloride transport by intestinal current measurements (ICM) in rectal biopsies and/or FIS on rectal organoids [12, 24, 25].

The logarithmic correlation is in line with McCAGUE *et al.* [26], who showed a semilogarithmic correlation between sweat chloride of subjects with 226 different genotypes and the CFTR function in Fisher rat thyroid cells (FRT). Although the number of mutations assessed by McCAGUE *et al.* is much higher, the correlation ( $r^2=0.67$ ) is not as tight as in our dataset ( $r^2=0.87$ ). Indeed, organoids allow assessment of CFTR function in native tissue with the entire genetic background of the subject, compared to heterologous cell lines expressing only a mutant CFTR common to the subject, as is done in FRT cells. Furthermore, in FRT cells, the mutations are in the cDNA context without introns, jeopardising the analysis of mutations that affect splicing and nonsense mRNA-mediated decay [27]. This favours organoids *versus* heterologous cell line models for the assessment of mutations and modulators on CFTR function. The results obtained for I1234V, E831X and R334W in organoids contradict observations in the FRT cells [28]. Organoid results are more in line with what is known about these mutations (supplementary data). Discrepancies between findings in organoids and FRT cells have been reported before. No benefit of ivacaftor was seen in patients with a G970R mutation [8], behaving as an ivacaftor-responsive gating mutation in FRT cells [27]. Subsequently, no effect of ivacaftor was seen in organoids with the G970R mutation, and the mutation was shown to induce alternative splicing with very limited protein production [29]. This illustrates the superiority of using the patients' own tissue rather than heterologous expression of mutations in nonhuman cell lines.

The increase in CFTR function by modulators was also captured by means of ICM in native rectal tissue [30, 31], with changes in CFTR-mediated chloride transport correlated to changes in sweat chloride, but not in lung function. Residual CFTR function, measured by means of the FIS assay and of ICM [25], correlates with sweat chloride concentration. A correlation between FEV<sub>1</sub> and residual CFTR function on ICM was previously found [25]. The absence of correlation in our cohort could be explained by the larger age heterogeneity of our cohort or by fundamental differences in the physiology of the assay.

In organoids, both the correctors and the potentiators are added *in vitro*. ICM is performed on fresh biopsies resulting in faster results, the correctors have to be administered to the patients before executing the assay. The FIS assay does not allow comparison to wild-type CFTR function, as pre-swelling of non-CF organoids results in little additional effect of CFTR activators or modulators. Organoid cultures can be stored in biobanks, allowing later retesting when new drugs become available and easy exchanges between labs for remote testing or for research purposes.

We observed high levels of CFTR functional rescue in organoids of several subjects with rare mutations like E92K, Q237E and L159S (the latter is not yet described in the CFTR2 database [3]). E92K is rescued by lumacaftor, concurring with results in heterologous cell systems [32, 33]. FIS in E92K organoids was slightly higher with ivacaftor–lumacaftor than lumacaftor alone, suggesting impaired channel gating of rescued E92K. This common mutation in the Chuvash Russian population [34, 35] would be a good candidate for combination modulator treatment.

We showed direct proof of clinical benefit in two subjects with high CFTR rescue in organoids, one homozygous for Q359K\_T360K and the second with genotype E60K/I507del, the rescue being derived from the E60K allele. For the remaining genotypes, responses to modulators were in line with what was already known about the mutations from heterologous cell systems and *in silico* predictions (supplementary data).

Our study's strengths come from reporting on CFTR function in cultures derived from tissues of individual subjects in a large cohort with different genotypes. We showed excellent correlations between organoid responses to modulators and improvement in clinical trials. In addition, we identified several rare mutations that may be amenable to treatment with the already approved modulators.

One weakness of our study is that we could correlate *in vitro* response to clinical improvement in only two subjects. The high cost of modulators and lack of approval for rare mutations are still hurdles to the performance of therapeutic trials. However, for other rare mutations, we provide convincing results of rescue in organoids backed up by knowledge of how these mutations disturb the normal CFTR structure or function.



Overall, our results confirm that the study of CFTR function and its rescue in rectal organoids opens a path to personalised therapies. This is especially relevant for patients with rare mutations unlikely to enter clinical trials, given the high number of rare mutations and the low number of subjects per mutation. Using organoids as biomarker to select responders to modulators opens a new horizon for these patients. We identify several new mutations that respond well to modulator therapies: some are ultra-rare (L159S, Q237E), whereas others occur in hundreds of European patients (R334W and E92K).

**Acknowledgements:** We thank the patients and parents who participated in this study. We thank Els Aertgeerts (Department of Pediatric Pulmonology, University Hospital Leuven, Leuven, Belgium); Karolien Bruneel (Department of Pediatric Pneumology, UZ Brussel, Brussels, Belgium); Claire Collard (Service de Pédiatrie, CHU Liège, Liège, Belgium); Liliane Collignon (Department of Pulmonology, Erasme University Hospital, Brussels); Monique Delfosse (Service de Pédiatrie, CHU Liège); Anja Delporte (Department of Paediatrics, Universitair Ziekenhuis, Ghent, Belgium); Nathalie Feyaerts (Department of Pediatric Pulmonology, University Hospital Leuven); Cécile Lambremont (Service de Pédiatrie, CHU Liège); Lut Nieuwborg (Department of Pulmonology, Erasme University Hospital); Nathalie Peeters (Department of Pulmonology, University Hospital Antwerp, Antwerp, Belgium); Ann Raman (Department of Paediatrics, Universitair Ziekenhuis); Pim Sansen (Department of Pulmonology, University Hospital Antwerp); Hilde Stevens (Department of Pediatrics, Antwerp University Hospital); Marianne Schulte (Department of Pediatric Pulmonology, University Hospital Leuven); Els Van Ransbeek (Department of Pediatric Pneumology, UZ Brussel); Christel Van de Brande (Department of Pediatric Pneumology, UZ Brussel); Geert Van den Eynde (Department of Pulmonology, University Hospital Antwerp); Marleen Vanderkerken (Department of Paediatrics, Universitair Ziekenhuis); Inge Van Dijck (Department of Pulmonology, University Hospital Antwerp); Audrey Wagener (Service de Pédiatrie, CHU Liège); Monika Waskiewicz (Department of Pediatrics, Antwerp University Hospital); Bernard Wenderickx (Hôpital Universitaire des Enfants Reine Fabiola, Brussels) for logistic support. We also thank Stefan Joris and Jan Vanleeuwe from the Mucovereniging/Association Muco for their financial support.

**Belgian Organoid Project:** Hedwige Boboli (CHR Citadelle, Liège, Belgium), Linda Boulanger (University Hospital Leuven, Belgium), Georges Casimir (HUDERF, Brussels, Belgium), Senne Cuyx (KU Leuven and UZ Leuven, Belgium), Benedicte De Meyere (University Hospital Ghent, Belgium), Elke De Wachter (University Hospital Brussels, Belgium), Danny De Looze (University Hospital Ghent, Belgium), Isabelle Etienne (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Laurence Hanssens (HUDERF, Brussels), Christiane Knoop (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Monique Lequesne (University Hospital Antwerp, Belgium), Vicky Nowé (vzw Gasthuiszusters Antwerp, Belgium), Stephanie Van Biervliet (University Hospital Ghent, Belgium), Eva Van Braeckel (University Hospital Ghent, Belgium), Kim Van Hoorenbeek (University Hospital Antwerp, Belgium), Eef Vanderhelst (University Hospital Brussels, Belgium), Stijn Verhulst (University Hospital Antwerp, Belgium), Stefanie Vincken (University Hospital Brussels, Belgium).

**Author contributions:** Conceptualisation: A.S. Ramalho, F. Vermeulen and K. De Boeck; methodology: A.S. Ramalho, E. Fürstová, J.M. Beekman, A.M. Vonk, C. Vazquez Cordero, M. Ferrante, F. Vermeulen, M. Proesmans, M. Boon and L. Dupont; recruiting of subjects and collection of rectal biopsies: M. Boon, M. Proesmans, F. Vermeulen, C. Vazquez Cordero, L. Dupont and I. Sarouk, Belgian Organoid Project participants; culturing the organoids and performing the FIS assay analysis: A.S. Ramalho and E. Fürstová; analysis of the results and figures preparation: A.S. Ramalho and F. Vermeulen; writing the original draft: A.S. Ramalho, F. Vermeulen and K. De Boeck; review and editing: all; supervision: F. Vermeulen and K. De Boeck.

**Conflict of interest:** A.S. Ramalho has nothing to disclose. E. Fürstová has nothing to disclose. A.M. Vonk has nothing to disclose. M. Ferrante reports grants and personal fees from Amgen, grants, personal fees and non-financial support from Biogen, Janssen, Pfizer and Takeda, personal fees and non-financial support from Boehringer Ingelheim, MSD, Falk and Ferring, personal fees from Sandoz, Lampro, and Mylan, outside the submitted work. C. Verfaillie has nothing to disclose. L. Dupont has nothing to disclose. M. Boon is a member of the European Reference Network for Rare Respiratory Diseases (ERN-LUNG) – Project ID number 739546. M. Proesmans has nothing to disclose. J.M. Beekman reports personal fees from various industries (Vertex, Proteostasis, Teva, others) for costs related to conference presentations, outside the submitted work; and has a patent WO2013093812A3 with royalties paid by Hubrecht Organoid Technology. I. Sarouk has nothing to disclose. C. Vazquez Cordero has nothing to disclose. F. Vermeulen has nothing to disclose. K. De Boeck has provided consultancy for Boehringer, Protalix, Raptor, Novabiotics, Eloxx and Chiesi, has been member of steering committees/advisory boards and been PI in studies for Vertex, has provided consultancy and been PI in studies for Galapagos, and has received speaker fees from Teva, outside the submitted work.

**Support statement:** This study was funded by the Belgian CF patients' association "Mucovereniging/Association Muco" and the Flemish Research Foundation (FWO – Fonds voor Wetenschappelijk Onderzoek – Vlaanderen – C3 project). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

## References

- 1 Cystic Fibrosis Mutation Database. [www.genet.sickkids.on.ca/statisticspage.html](http://www.genet.sickkids.on.ca/statisticspage.html) Date last accessed: July 8, 2019.
- 2 Orenti A, Zolin A, Naehrlich L, *et al.* 2018. 2016 ECFS Patient Registry Annual Report; 40. Available from: [www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports](http://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/annual-reports).
- 3 The Clinical and Functional Translation of CFTR (CFTR2). CFTR2 Variant List History Date last accessed: July 8, 2019. [www.cftr2.org/mutations\\_history](http://www.cftr2.org/mutations_history)
- 4 Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, *et al.* Lumacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015; 373: 220–231.
- 5 Middleton PG, Mall MA, Dřevínek P, *et al.* Elexacaftor–tezacaftor–ivacaftor for cystic fibrosis with a single Phe508del allele. *N Engl J Med* 2019; 381: 1809–1819.

- 6 Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, *et al.* Efficacy and safety of the elxacaftor 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: 1940–1948.
- 7 Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, *et al.* A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med* 2011; 365: 1663–1672.
- 8 De Boeck K, Munck A, Walker S, *et al.* Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros* 2014; 13: 674–680.
- 9 Moss RB, Flume PA, Elborn JS, *et al.* Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have an Arg117His-CFTR mutation: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2015; 3: 524–533.
- 10 Cuyx S, De Boeck K. Treating the underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator defect in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2019; 40: 762–774.
- 11 Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, *et al.* A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 2013; 19: 939–945.
- 12 de Winter-de Groot KM, Janssens HM, van Uum RT, *et al.* Stratifying infants with cystic fibrosis for disease severity using intestinal organoid swelling as biomarker of CFTR function. *Eur Respir J* 2018; 52: 1702529.
- 13 Beekman JM, Wang CM, Casati S, *et al.* Biobanking: towards increased access of biomaterials in cystic fibrosis. Report on the pre-conference meeting to the 13th ECFS Basic Science Conference, Pisa, 30 March–2 April, 2016. *J Cyst Fibros* 2017; 16: 616–621.
- 14 Dekkers JF, Berkers G, Kruijselbrink E, *et al.* Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2016; 8: 344ra84.
- 15 Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, *et al.* Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: a successful patient-oriented research collaboration. *Curr Opin Pulm Med* 2016; 22: 610–616.
- 16 Farrell PM, White TB, Ren CL, *et al.* Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* 2017; 181: S4–S15.
- 17 Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, *et al.* Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protocols* 2020; 1: 100019.
- 18 Boyle MP, Bell SC, Konstan MW, *et al.* A CFTR corrector (lumacaftor) and a CFTR potentiator (ivacaftor) for treatment of patients with cystic fibrosis who have a phe508del CFTR mutation: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* 2014; 2: 527–538.
- 19 Rowe SM, McColley SA, Rietschel E, *et al.* Lumacaftor/ivacaftor treatment of patients with cystic fibrosis heterozygous for F508del-CFTR. *Ann Am Thorac Soc* 2017; 14: 213–219.
- 20 Flume PA, Liou TG, Borowitz DS, *et al.* Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest* 2012; 142: 718–724.
- 21 Clancy J, Rowe SM, Accurso FJ, *et al.* Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* 2012; 67: 12–18.
- 22 Ratjen F, Hug C, Marigowda G, *et al.* Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med* 2017; 5: 557–567.
- 23 Dekkers JF, Gogorza Gondra RA, Kruijselbrink E, *et al.* Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *Eur Respir J* 2016; 48: 451–458.
- 24 Sousa M, Servidoni MF, Vinagre AM, *et al.* Measurements of CFTR-mediated Cl<sup>-</sup> secretion in human rectal biopsies constitute a robust biomarker for cystic fibrosis diagnosis and prognosis. *PLoS One* 2012; 7: e47708.
- 25 Hirtz S, Gonska T, Seydewitz HH, *et al.* CFTR Cl<sup>-</sup> channel function in native human colon correlates with the genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 2004; 127: 1085–1095.
- 26 McCague AF, Raraigh KS, Pellicore MJ, *et al.* Correlating cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function with clinical features to inform precision treatment of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 199: 1116–1126.
- 27 Clancy JP, Cotton CU, Donaldson SH, *et al.* CFTR modulator therotyping: current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros* 2019; 18: 22–34.
- 28 Van Goor F, Yu H, Burton B, *et al.* Effect of ivacaftor on CFTR forms with missense mutations associated with defects in protein processing or function. *J Cyst Fibros* 2014; 13: 29–36.
- 29 Fidler MC, Sullivan JC, Boj SF, *et al.* WS18.5 Evaluation of the contributions of splicing and gating defects to dysfunction of G970R-CFTR. *J Cyst Fibros* 2017; 16: S31.
- 30 Graeber SY, Hug MJ, Sommerburg O, *et al.* Intestinal current measurements detect activation of mutant CFTR in patients with cystic fibrosis with the G551D mutation treated with ivacaftor. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 192: 1252–1255.
- 31 Graeber SY, Dopfer C, Naehrlich L, *et al.* Effects of lumacaftor–ivacaftor therapy on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in Phe508del homozygous patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 197: 1433–1442.
- 32 Han ST, Rab A, Pellicore MJ, *et al.* Residual function of cystic fibrosis mutants predicts response to small molecule CFTR modulators. *JCI Insight* 2018; 3: e121159.
- 33 Ren HY, Grove DE, De La Rosa O, *et al.* VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell* 2013; 24: 3016–3024.
- 34 Stepanova AA, Abrukova AV, Savaskina EN, *et al.* Mutation p.E92K is the primary cause of cystic fibrosis in Chuvashes. *Russ J Genet* 2012; 48: 731–737.
- 35 Petrova NV, Kashirskaya NY, Saydaeva DK, *et al.* Spectrum of CFTR mutations in Chechen cystic fibrosis patients: high frequency of c.1545\_1546delTA (p.Tyr515X; 1677delTA) and c.274G>A (p.Glu92Lys, E92K) mutations in North Caucasus. *BMC Med Genet* 2019; 20: 44.

- 4.2. 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.

V tomto článku jsme jako první publikovali *in vitro* srovnání nejnovějšího CFTR modulátoru, kombinujícího elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ETI) s lékem předchozí generace tezacaftor/ivacaftor pomocí střevních organoidů za využití FIS experimentu u 17 pacientů se totožným *CFTR* genotypem F508del/F508del. U všech pacientů byla zároveň provedena sekvenace *CFTR* genu s cílem identifikovat potenciální nové varianty, které by mohly vysvětlovat variabilitu v *in vitro* odpovědi.

Prokázali jsme signifikantně lepší *in vitro* výsledky ETI ve srovnání s CFTR modulátorem tezacaftor/ivacaftor. Pozorovali jsme značnou variabilitu v *in vitro* odpovědi mezi jednotlivými pacienty, obdobně jako v předchozí publikaci.

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 VUS (variant of unknown significance, varianta nejasného významu).

Naše výsledky zdůraznily individuální variabilitu *in vitro* odpovědi na CFTR modulátory. Přítomnost dalších variant *CFTR* genu a individuální genetické rozdíly mohou ovlivnit reakci na léčbu, což zdůrazňuje potřebu personalizovaného přístupu k léčebné strategii u pacientů s CF.





## Short Communication

## Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis

Eva Furstova<sup>a,b</sup>, Tereza Dousova<sup>a</sup>, Jakub Beranek<sup>b</sup>, Malgorzata Libik<sup>c</sup>, Libor Fila<sup>d</sup>, Martin Modrak<sup>e</sup>, Ondrej Cinek<sup>a</sup>, Milan Macek Jr<sup>c</sup>, Pavel Drevinek<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>d</sup> Department of Pulmonology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic

<sup>e</sup> Department of Bioinformatics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 March 2021

Revised 11 June 2021

Accepted 14 July 2021

Available online 2 August 2021

## Keywords:

Cystic fibrosis

Intestinal organoids

Elexacaftor

Tezacaftor

Ivacaftor

CFTR sequence

## ABSTRACT

Superior efficacy of elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ELX/TEZ/IVA) over tezacaftor/ivacaftor (TEZ/IVA) in people with cystic fibrosis (CF) and Phe508del/Phe508del genotype was shown in clinical trials. We utilized intestinal organoid approach to compare *in vitro* responses to these 2 CFTR modulator drug combinations and to check potential inter-individual variability in therapeutic response to the triple combination. Organoids from 17 subjects with Phe508del/Phe508del were screened with forskolin induced swelling assay. Significantly larger swelling, when exposed to ELX/TEZ/IVA as compared to TEZ/IVA, was observed in 16 of them. However, 1 sample showed no additional effect of ELX. The finding of unique CFTR variants in this sample indicates that genetic traits other than CF-causing CFTR mutation are worth exploring as they may have an impact on the definitive modulator drug response.

© 2021 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

New pharmacotherapies targeting the underlying cause of cystic fibrosis (CF) have a significant impact on clinical outcome as well as on the quality of life and life expectancy of people with CF [1]. These drugs termed CFTR modulators can restore the CFTR ion-channel function, albeit their efficacy is determined by the presence of certain CFTR mutations. Three genotype-specific CFTR modulator drugs combining 2 to 3 small molecules were approved for treatment of people carrying Phe508del/Phe508del ( $\Delta F/\Delta F$ ): lumacaftor/ivacaftor (LUM/IVA, Orkambi®, Vertex Pharmaceuticals, 2015), tezacaftor/ivacaftor (TEZ/IVA, Symkevi®, Vertex Pharmaceuticals, 2018) and elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ELX/TEZ/IVA, Kaftrio®, Vertex Pharmaceuticals, 2020). Their overall efficacy has been proven in multiple clinical trials [2–4], but inter-individual differences in response to the treatment have been also shown.

Similarly, inter-individual variability was observed during *in vitro* experiments on intestinal organoids with TEZ/IVA and LUM/IVA [5]. Patient-derived intestinal organoids, a tool to predict the treatment response to different CFTR modulators using forskolin induced swelling (FIS) assay [6–8], indicated that there was a moderate to high correlation between *in vitro* CFTR function and clinical biomarkers such as ppFEV1 (percent predicted force expiratory volume in 1 second) and sweat chloride concentration [7,9]. Interestingly, de Winter et al. suggested that even small differences in CFTR function may affect disease progression [5].

We aimed to test the biological response to the latest approved CFTR modulator combination ELX/TEZ/IVA in intestinal organoids as it has not been established yet. Based on clinical trial data [4], we hypothesized that ELX/TEZ/IVA was superior in the extent of this *in vitro* response to other approved CFTR modulators eligible for  $\Delta F/\Delta F$  individuals.

## 2. Methods

We collected rectal biopsies from 17 CF subjects with  $\Delta F/\Delta F$  genotype upon obtaining their informed consent, approved by the Motol University Hospital Ethics committee (for subject characteristics see Supplemental Table 1). Biopsy samples were cultured according to the previously described protocols [10–11]. Grown

Abbreviations: ELX, elexacaftor; TEZ, tezacaftor; LUM, lumacaftor; IVA, ivacaftor; CF, cystic fibrosis; FIS, forskolin induced swelling; VUS, variant of unknown significance; ppFEV1, percent predicted force expiratory volume in 1 second; CFTR, cystic fibrosis conductance regulator;  $\Delta F/\Delta F$ , Phe508del/Phe508del.

\* Corresponding author at: Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Motol University Hospital, V Uvalu 84, 15000 Prague 5, Czech Republic.

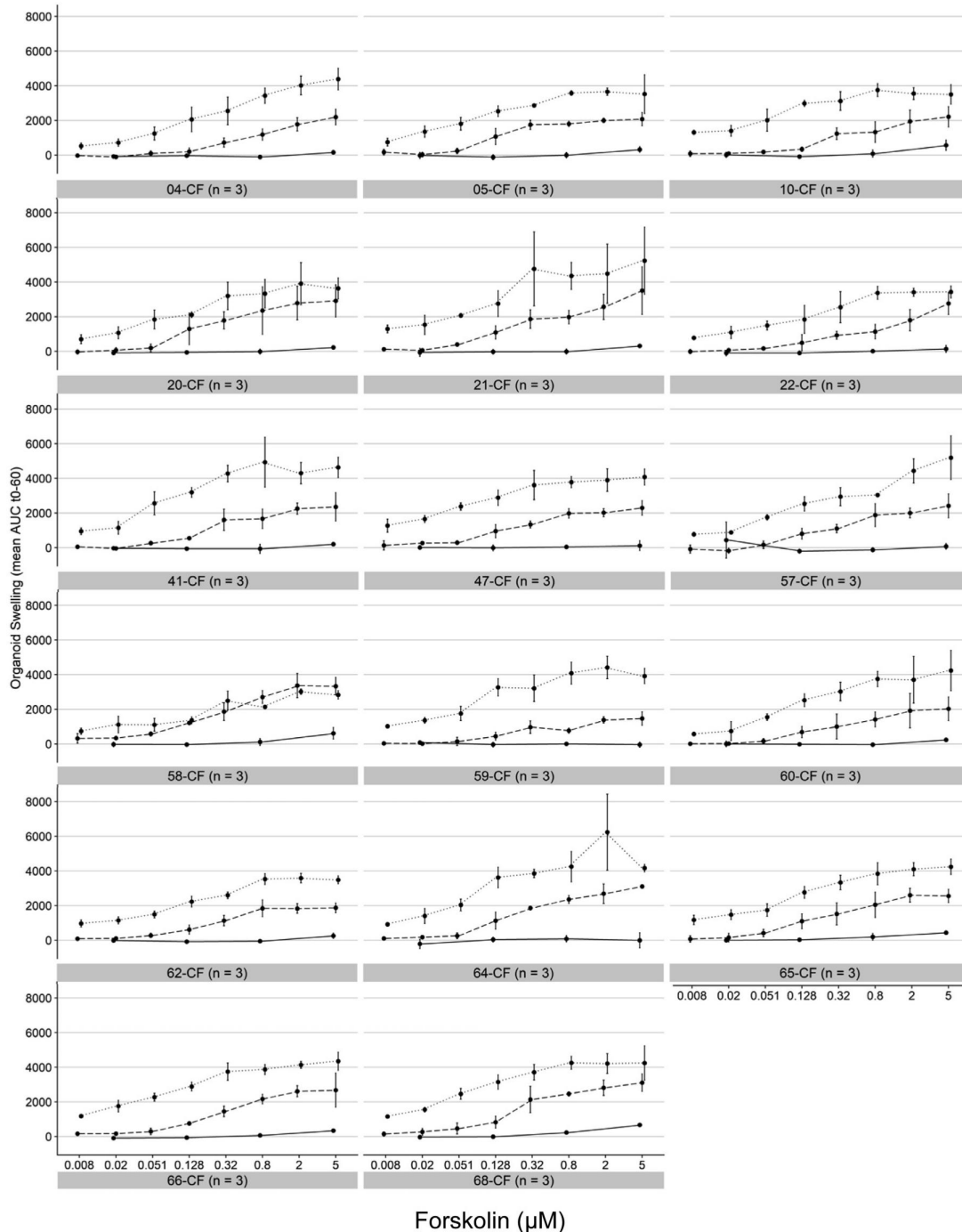
E-mail address: [pavel.drevinek@lfmotol.cuni.cz](mailto:pavel.drevinek@lfmotol.cuni.cz) (P. Drevinek).

<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2021.07.006>

1569–1993/© 2021 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

intestinal organoids were mechanically split and plated in 96-well plate, treated approx. for 20 hours with a) 3  $\mu$ M TEZ (Selleckchem, USA), b) 3  $\mu$ M TEZ and 2  $\mu$ M ELX (Selleckchem, USA) or c) without any modulator added. The concentration of ELX was established based on previous experiments on human bronchial epithelial cells [12]. Organoids were stained with 3 $\mu$ M calcein green (Invitrogen, USA) for 30 min prior to the FIS assay that was performed immediately after adding the solutions with 3 $\mu$ M IVA (Selleckchem,

USA) and/or forskolin of various concentrations (Selleckchem, USA) [13]. Each experimental condition was run in triplicates. Swelling of organoids was visualized with a confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica Microsystems, Germany). Acquired images were analysed using CellProfiler software [14]. We calculated the AUC (absolute area under the curve) from mean percentage of organoids swelling (baseline = 100%, t = 60 min). We employed a linear model with the full interaction of the forskolin level and drug as



**Fig. 1.** FIS assays in intestinal organoids from subjects carrying Phe508del/Phe508del CFTR genotype. Average AUC during 1 hour experiment and standard deviation using 3 different conditions: forskolin only (solid line), TEZ/IVA (dashed line), ELX/TEZ/IVA (dotted line). n = replicates of the experiment per subject. The error bars represent +/- 1 standard deviation.



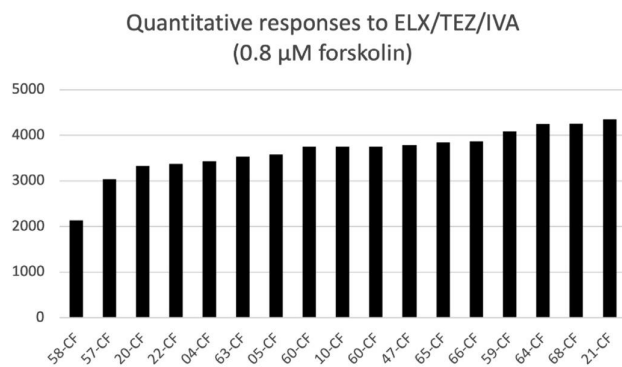


Fig. 2. Responses to ELX/TEZ/IVA at 0.8 μM forskolin.

predictors and used the Tukey method to correct for multiple comparisons. The analysis was performed using the R language [15], see Supplementary statistical analysis material for the full code.

### 3. Results and discussion

Significantly larger swelling was observed in organoids exposed to ELX/TEZ/IVA compared to TEZ/IVA in all forskolin concentrations (all  $p < 0.001$ ) (Fig. 1). However, we noted differences in the response between individual organoids, which suggest that the extent of organoids swelling may reflect the inter-individual variability seen in clinical trials [4]. The most striking and somewhat unexpected finding in our study was essentially no additional response to ELX on top of TEZ/IVA (Fig. 1, subject 58-CF) as both TEZ/IVA and ELX/TEZ/IVA combinations resulted in similar organoid swelling. The summarized differences between subjects' responses to ELX/TEZ/IVA at a single forskolin concentration are shown in Fig. 2.

The CFTR gene analysis (Supplemental Table 2) showed that subject 58-CF harboured 4 CFTR variants, not present in any of 14 remaining subjects whose DNA analysis results were available. Moreover, the variant c.2658-37T>C has not yet been described elsewhere; we classified it as a variant of unknown significance (VUS) by using several independent bioinformatics tools and in accordance with the guidelines of American College of Medical Genetics (Supplemental Table 2). The presence of the variants in the only organoid sample that failed to prove the beneficial effect of ELX may mean that they affect the target site for ELX, leading to the unresponsiveness to this molecule. Although we cannot rule out the impact of other genetic factors such as disease modifying genes [16] on the final effect of ELX, our results underlines the need to explore the relationship between the genetic background and individual drug responses. Such knowledge is crucial for further development of the precision medicine concept in CF [17,18]. It is of note that until now, none of the studied subjects has been on the CFTR modulator therapy; thus no clinical data can be provided to compare *in vitro* and *in vivo* treatment response.

In conclusion, this is to the best of our knowledge the first report comparing the TEZ/IVA and ELX/TEZ/IVA effects on intestinal organoids. We observed *in vitro* superiority of ELX/TEZ/IVA over TEZ/IVA in all but 1 subjects carrying Phe508del/Phe508del. The unique CFTR variants may play a role in the lack of *in vitro* response to the ELX.

#### Author statement

Methodology: EF, TD, PD, OC; Recruiting subjects: TD, LF; Collection of biopsies: EF; Organoids cultures and FIS assays: EF,

JB; Data analysis: EF; Statistics: MM; Writing: EF; Genetic analysis: ML, MMJr; Review and editing: all.

#### Declaration of Competing Interest

All authors declare no conflict of interest.

#### Funding

This work was supported by the Charles University, project GA UK no 1034819; Ministry of Health of the Czech Republic, grant no NU20-07-00049.

#### Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jcf.2021.07.006.

#### References

- [1] Balfour-Lynn IM, King JA. CFTR modulator therapies – effect on life expectancy in people with cystic fibrosis. *Paediatric respiratory reviews*. WB Saunders Ltd; 2020.
- [2] 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* Jul 2015;373(3):220–31.
- [3] Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, van der Ent CK, Moeller A, Simard C, et al. Tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del. *N Engl J Med* Nov 2017;377(21):2013–23.
- [4] 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 North Am Ed* Nov 2019;394(10212):1940–8.
- [5] de Winter – de Groot KM, Berkers G, Marck – van der Wilt REP, van der Meer R, Vonk A, Dekkers JF, et al. Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. *J Cyst Fibros* Jul 2020;19(4):614–619.
- [6] de Poel E, Lefferts JW, Beekman JM. Intestinal organoids for Cystic Fibrosis research. Vol. 19, *Journal of Cystic Fibrosis*. Elsevier B.V.; 2020. p. S60–4.
- [7] Ramalho AS, Furstová 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* Jan 2021;57(1).
- [8] Noordhoek J, Gulmans V, van der Ent K, Beekman JM. Intestinal organoids and personalized medicine in cystic fibrosis: A successful patient-oriented research collaboration. Vol. 22, *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 610–16.
- [9] Berkers G, van Mourik P, Vonk AM, Kruijselbrink E, Dekkers JF, de Winter-de Groot KM, et al. Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis. *Cell Rep* Feb 2019;26(7):1701–8 e3.
- [10] Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* May 2009;459(7244):262–5.
- [11] Dekkers JF, Berkers G, Kruijselbrink E, Vonk A, de Jonge HR, Janssens HM, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis [Internet]. Available from: www.CFTR2.org
- [12] Keating D, Marigowda G, Burr L, Daines C, Mall MA, McKone EF, et al. VX-445–tezacaftor–ivacaftor in patients with cystic fibrosis and one or two Phe508del alleles. *N Engl J Med* Oct 2018;379(17):1612–20.
- [13] 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(7):939–45 Jul.
- [14] Jones TR, Kang IH, Wheeler DB, Lindquist RA, Papallo A, Sabatini DM, et al. CellProfiler Analyst: Data exploration and analysis software for complex image-based screens. *BMC Bioinformatics* Nov 2008;9.
- [15] Core Team R. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. URL <https://www.R-project.org/>.
- [16] Strug LJ, Gonska T, He G, Keenan K, Ip W, Böelle PY, et al. Cystic fibrosis gene modifier SLC26A9 modulates airway response to CFTR-directed therapeutics. *Hum Mol Genet* 2016;25(20):4590–600.
- [17] Chen KG, Zhong P, Zheng W, Beekman JM. Pharmacological analysis of CFTR variants of cystic fibrosis using stem cell-derived organoids. Vol. 24, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2019. p. 2126–38.
- [18] Marson FAL, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Personalized or precision medicine?. The example of cystic fibrosis. Vol. 8, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media SA; 2017.

- 4.3. 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.

Tato studie měla za cíl zjistit, zda FIS vyšetření prováděné na střevních organoidech predikuje klinické výsledky u pacientů s CF homozygotních pro mutaci F508del, kteří jsou léčeni ETI. A to konkrétně zda lepší *in vitro* výsledek FIS predikuje i lepší klinickou odpověď na léčbu.

FIS vyšetření bylo provedeno u 70 pacientů s totožným genotypem F508del/F508del jako rozšíření naší předchozí publikace, kde jsme testovali 17 pacientů (4.2.). Potvrdili jsme významnou převahu ETI nad CFTR modulátorem tezakaftor/ivakaftor *in vitro*. Opět byla pozorována značná variabilita AUC mezi jednotlivými pacienty.

Z této kohorty bylo již 38 pacientů na léčbě ETI po dobu alespoň 12 měsíců. Klinická data byla monitorována během každé návštěvy v CF centru. Před zahájením terapie a dále 1, 3, 6, 9 a 12 měsíců na léčbě byly monitorovány plicní funkce (FEV1) a stav výživy (BMI). Před zahájením terapie a 6 měsíců na léčbě byly vyšetřovány chloridy v potu a u dětské populace jsme navíc hodnotili i vyplněné dotazníky kvality života.

Bylo pozorováno signifikantní zlepšení klinických parametrů na léčbě u všech pacientů, ale nebyla nalezena žádná významná korelace mezi FIS (hodnotami AUC) a změnou FEV1, BMI nebo chloridů v potu.

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.

Tato studie zdůrazňuje limitace FIS na střevních organoidech jako prediktivního nástroje u homogenní skupiny pacientů s CF, kteří mají nasazenou stejnou léčbu. Lepší FIS výsledek (tj. vyšší hodnoty AUC) nepředpovídá lepší klinickou odpověď.



## Precision medicine in cystic fibrosis: predictive role of forskolin-induced swelling assay

To the Editor:

Copyright ©The authors 2024.  
For reproduction rights and  
permissions contact  
permissions@ersnet.org

Received: 22 Nov 2023  
Accepted: 6 March 2024

People with cystic fibrosis (CF) carrying at least one copy of the F508del allele can benefit from a small molecule therapy referred to as cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) modulators (CFTRm). The triple CFTRm combination elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (ELX/TEZ/IVA) has been shown to markedly improve clinical outcomes such as the percentage of predicted forced expiratory volume in 1 s (ppFEV<sub>1</sub>) and body mass index (BMI) [1]; however, granular data from the same clinical trial also showed that the treatment response to CFTRm varied among people with CF, even among those carrying the same *CFTR* genotype. To date, only short-circuit current measurements on human nasal epithelial cells have been validated as a predictive biomarker of CFTRm treatment response [2]. The forskolin-induced swelling assay (FIS) performed on patient-derived intestinal organoids (IOs) has been tested as another candidate tool for predicting the CFTRm response [3–5]. To date, no studies have compared the extent of FIS (*i.e.* numeric values of the area under the curve (AUC)) and the magnitude of clinical response to ELX/TEZ/IVA in real life. Thus, we investigated this correlation to assess whether the FIS can predict clinical outcomes in F508del homozygous people with CF treated with ELX/TEZ/IVA.

Rectal biopsy, IOs cultivation and FIS were performed according to previously described protocols [3, 6, 7]. Three replicates of the FIS experiment per subject and condition were performed to assure assay reproducibility. Images were analysed using CellProfiler software. We used the AUC at 0.128 μM forskolin to compare the overall effect of TEZ/IVA and ELX/TEZ/IVA on swelling of organoids obtained from 70 people with CF. The AUC was calculated from the mean percentage of the organoid area after a 1-h experiment. The following clinical data were retrieved at specific time points (months 1, 6 and 12 on therapy with ELX/TEZ/IVA) from medical records of 38 people with CF: ppFEV<sub>1</sub>, BMI and sweat chloride concentration (SCC). Children underwent quality of life assessment (CFQ-R; Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised). We correlated AUC with clinical parameters using the R language and a linear mixed-effect model with a random intercept for the ppFEV<sub>1</sub> and BMI. The SCC correlation was analysed by the standard linear model (two longitudinal measurements). In each model, baseline values of the outcome were used as a covariate. *p*-value was set at 0.05.

Significantly larger swelling was observed in organoids exposed to ELX/TEZ/IVA than in those exposed to TEZ/IVA at all forskolin concentrations (all *p*<0.001). We observed substantial interindividual variability for both CFTRm (similar to other publications [7, 8]): the AUC ranged from 28 to 1542 for TEZ/IVA (median 692) and from 1017 to 3757 for ELX/TEZ/IVA (median 2607), a finding which, in theory, may reflect the variability in clinical outcomes. If so, the magnitude of AUC change might serve as a predictor of the extent of the real-life response. However, the increase in AUC values did not correlate with the extent of clinical response (figure 1). General improvement in selected clinical parameters/biomarkers was observed for all 38 subjects who had been on ELX/TEZ/IVA for 12 months. SCC decreased from 99.5 to 37.5 mmol·L<sup>-1</sup> at month 6 (*p*<0.0001; values dropped below 30 mmol·L<sup>-1</sup> in 10 subjects); mean BMI increased from 20.0 to 21.8 kg·m<sup>-2</sup> at month 12 (*p*<0.001; range -4.3 to +5.2 kg·m<sup>-2</sup>); mean ppFEV<sub>1</sub> increased from 87% to 98% at month 12 (*p*<0.001; range -2% to +41%). Quality of life significantly improved in respiratory, digestive symptoms and eating disturbances CFQ-R domains at month 6 (*p*=0.001 to 0.038).

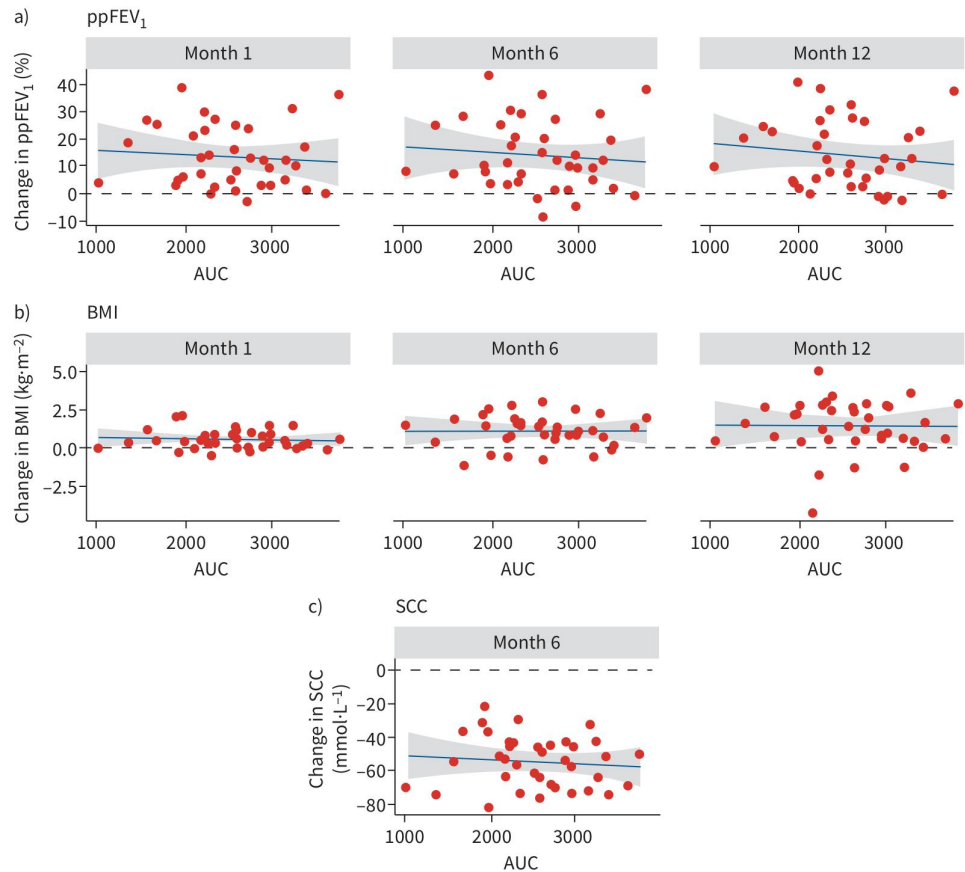
Shareable abstract (@ERSpublications)

**The FIS assay generally indicates responsiveness to CFTR modulators, but it cannot discriminate between high and low responders within the F508del homozygous subjects. Higher FIS response in intestinal organoids did not predict better clinical outcomes.** <https://bit.ly/3VgaHSj>

**Cite this article as:** 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: 2400156 [DOI: 10.1183/13993003.00156-2024].







**FIGURE 1** Changes in a) percentage of predicted forced expiratory volume in 1 s (ppFEV<sub>1</sub>), b) body mass index (BMI) and c) sweat chloride concentration (SCC) plotted against area under the curve (AUC) at specific time points. In all panels, the solid line represents a fitted linear trend, the grey area is a 95% confidence interval for the trend, each dot represents one person with cystic fibrosis (CF); y-axes show differences in clinical parameters at specific time points (month 6 for SCC; months 1, 6 and 12 for ppFEV<sub>1</sub> and BMI) compared to initiation of treatment; x-axes show AUC at 0.128  $\mu$ M forskolin of all 38 people with CF treated with elxacaftor/tezacaftor/ivacaftor; dashed lines represent no change. The trends are displayed as flat lines across the AUC or decreasing with higher AUC values (not statistically significant). Of note, the increase in AUC by 1000 units did not correspond to changes in ppFEV<sub>1</sub>, BMI or SCC. Estimated effect was  $-0.038$  (95% CI  $-0.083, 0.007$ ) for ppFEV<sub>1</sub>,  $0.075$  (95% CI  $-0.533, 0.683$ ) for BMI and  $-2.396$  (95% CI  $-10.207, 5.415$ ) for SCC.

Of note, the overall relationship between AUC and clinical data has been studied before but to a much lesser extent. DE WINTER-DE GROOT *et al.* [9] reported the correlation between CFTR residual response measured by FIS in IOs (*in vitro* response to forskolin only, without adding any CFTRm) and selected markers: immunoreactive trypsinogen, pancreatic sufficiency, SCC and intestinal current measurements (ICM) in 34 newborns with various *CFTR* genotypes. Another study of 173 subjects comprising a broad spectrum of *CFTR* genotypes found a correlation between FIS-measured residual CFTR response (AUC in the presence of forskolin only) and ppFEV<sub>1</sub> but not with SCC [10]. A more recent investigation by DE WINTER-DE GROOT *et al.* [11] found positive correlations between FIS, ppFEV<sub>1</sub> and BMI in 34 people with CF homozygous for F508del, but using a modified FIS design (3-h exposure to high 5  $\mu$ M forskolin concentration). When using CFTRm in addition to forskolin, studies did not find any association between FIS and short-term clinical or ICM response to lumacaftor/ivacaftor (LUM/IVA) or IVA in a group of F508del homozygotes [12], or with various *CFTR* residual function variants [13]. Only BERKERS *et al.* [14] have shown a correlation between FIS response to IVA and LUM/IVA and ppFEV<sub>1</sub> and SCC in 24 people with CF (various *CFTR* genotypes).

Our study differed from the previously published studies in several aspects: 1) the use of ELX/TEZ/IVA; 2) the larger size of a “genotype-uniform” cohort (involving 70 people with CF for *in vitro* analysis and

38 of them for investigating the correlation with the clinical outcome); 3) the duration of CFTRm treatment follow-up (12 months); and 4) the goal was to correlate the magnitude of AUC and the extent of clinical improvement.

The missing correlation between the AUC and clinical parameters in response to ELX/TEZ/IVA was rather surprising since AUC is unambiguously a robust parameter to distinguish between organoids exposed to ELX/TEZ/IVA versus TEZ/IVA. Thus, we initially hypothesised that the rule “greater AUC value, the more pronounced clinical response” can be applied for comparison among ELX/TEZ/IVA-treated organoids, which widely differ by their AUC. Nevertheless, we observed improvement in selected clinical parameters (ppFEV<sub>1</sub>, BMI, SCC, CFQ-R) in people with CF treated with ELX/TEZ/IVA irrespective of their *in vitro* AUC values.

One explanation for the lack of correlation is a possible ceiling effect of ELX/TEZ/IVA *in vitro*, where overall extremely high AUC values reflect the utmost susceptibility of IOs to the presence of ELX/TEZ/IVA. Simply, such a very high level of reaction seems not to allow for discrimination between different levels of response to CFTRm. Furthermore, the AUC might reflect the clinical response only at a very rough level and only large differences in AUC for different CFTRm treatment options and genotypes would indeed predict substantial differences in clinical response (e.g. ELX/TEZ/IVA versus TEZ/IVA). However, AUC failed to reflect smaller differences in clinical response within a homogeneous group receiving the same CFTRm treatment.

We acknowledge several limitations. First, a moderate sample size (n=38) was included in the observational part of the study, yet it is more than any other study published so far on a uniform cohort of subjects with the same genotype [14]. Second, the potential variability in the assay results due to factors such as cell culture conditions and sample handling. To reduce this limitation, we performed three independent replicates of the experiment for each subject. Third, the complexity of CF phenotype is influenced by various factors beyond CFTR itself (interaction of environmental factors, disease modifiers such as chronic infections, inflammation, nutritional status, CF-modifying genes [15]). These aspects, along with treatment adherence and pharmacokinetics, may impact the correlation between *in vitro* results and clinical outcomes.

This is the first study comparing the magnitude of the FIS response to ELX/TEZ/IVA in IOs and the extent of real-life ELX/TEZ/IVA treatment outcomes. Our results indicate that FIS (*i.e.* AUC) is not a suitable tool for predicting the extent of the clinical response in a homogeneous group of F508del/F508del CF patients undergoing the same treatment. A higher AUC does not predict a better clinical response.

**Eva Furstova** <sup>1</sup>, **Pavel Drevinek** <sup>2</sup>, **Stepanka Novotna**<sup>2</sup>, **Malgorzata Libik**<sup>3</sup>, **Klara Benesova**<sup>4,5</sup>, **Lucie Borek-Dohalska**<sup>2</sup>, **Kristina Sakmarova**<sup>6</sup>, **Martin Modrak**<sup>6</sup>, **Milan Macek Jr**<sup>3</sup> and **Tereza Dousova**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Paediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>2</sup>Department of Medical Microbiology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>Department of Biology and Medical Genetics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>4</sup>Department of Clinical Psychology, Motol University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>5</sup>Department of Neurology and Centre for Clinical Neuroscience, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic. <sup>6</sup>Department of Bioinformatics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

Corresponding author: Pavel Drevinek ([pavel.drevinek@lfmotol.cuni.cz](mailto:pavel.drevinek@lfmotol.cuni.cz))

Ethics approval: The study was approved by the ethics committee of Motol University Hospital.

Conflict of interest: P. Drevinek declares honoraria for lectures from Vertex Pharmaceuticals and Chiesi CZ, and participation on advisory boards for Vertex Pharmaceuticals and Viartis, all in the 36 months prior to manuscript submission, and is the president of the Czech Society for Medical Microbiology. M. Macek Jr declares consulting fees from Devyser.com and Vertex Pharmaceuticals, and support for attending the European Cystic Fibrosis Conference from Chiesi Pharmaceuticals, all in the 36 months prior to manuscript submission. The remaining authors have no potential conflicts of interest to disclose.

Support statement: The study was supported by the Ministry of Health, Czechia (grant number NU20-07-00049), Charles University (GA UK number 176121), and the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (number LM2018132). Funding information for this article has been deposited with the Crossref Funder Registry.

### References

- 1 Heijerman HGM, McKone EF, Downey DG, *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: 1940–1948.
- 2 Dreano E, Burgel PR, Hatton A, *et al.* Theratyping cystic fibrosis patients to guide elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor out-of-label prescription. *Eur Respir J* 2023; 62: 2300110.
- 3 Dekkers JF, Berkens G, Kruiesselbrink E, *et al.* Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2016; 8: 344ra84.
- 4 Boj SF, Vonk AM, Statia M, *et al.* Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: an *in vitro* assay for assessing drug response in cystic fibrosis patients. *J Vis Exp* 2017; 2017: 55159.
- 5 Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, *et al.* Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protoc* 2020; 1: 100019.
- 6 Sato T, Vries RG, Snippert HJ, *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures *in vitro* without a mesenchymal niche. *Nature* 2009; 459: 262–265.
- 7 Furstova E, Dousova T, Beranek J, *et al.* Response to elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor in intestinal organoids derived from people with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2022; 21: 243–245.
- 8 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: 1902426.
- 9 de Winter-de Groot KM, Janssens HM, van Uum RT, *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: 1702529.
- 10 Muilwijk D, de Poel E, van Mourik P, *et al.* Forskolin-induced organoid swelling is associated with long-term cystic fibrosis disease progression. *Eur Respir J* 2022; 60: 2100508.
- 11 de Winter-de Groot KM, Berkens G, Marck-van der Wilt REP, *et al.* Forskolin-induced swelling of intestinal organoids correlates with disease severity in adults with cystic fibrosis and homozygous F508del mutations. *J Cyst Fibros* 2020; 19: 614–619.
- 12 Graeber SY, van Mourik P, Vonk AM, *et al.* Comparison of organoid swelling and *in vivo* biomarkers of CFTR function to determine effects of lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for the f508del mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2020; 202: 1589–1592.
- 13 Kerem E, Cohen-Cymbberknoh M, Tsabari R, *et al.* Ivacaftor in people with cystic fibrosis and a 3849110kb C→T or D1152H residual function mutation. *Ann Am Thorac Soc* 2021; 18: 433–441.
- 14 Berkens G, van Mourik P, Vonk AM, *et al.* Rectal organoids enable personalized treatment of cystic fibrosis. *Cell Rep* 2019; 26: 1701–1708.e3.
- 15 Strug LJ, Gonska T, He G, *et al.* Cystic fibrosis gene modifier SLC26A9 modulates airway response to CFTR-directed therapeutics. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 4590–4600.

- 4.4. 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.

Tato studie měla za cíl vyvinout a optimalizovat nový diagnostický nástroj pro CF pomocí obrazové analýzy morfologie střevních organoidů (ROMA, Rectal organoid morphology analysis), která rozlišuje mezi jedinci s CF a bez CF na základě morfologických rozdílů střevních organoidů.

Bylo vyšetřeno 167 pacientů s CF a 22 zdravých jedinců (non-CF). Střevní biopsie a kultivace střevních organoidů byly provedeny dle standardizovaných protokolů. Obrázky organoidů byly analyzovány zobrazovacím softwarem. 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. Podrobný protokol jsme následně publikovali viz 4.5.

K rozlišení CF a non-CF subjektů byla provedena diskriminační analýza Mann-Whitney a Fisherův exaktní test, perfektní diskriminace (AUC=1) byla dosažena pomocí lineární diskriminační analýzy. Hodnoty IR a CI spolehlivě odlišily CF a non-CF organoidy.

V publikaci 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 kanálu a tím zvýšit diagnostickou přesnost, zejména v složitých případech, kde jsou tradiční metody nejednoznačné. Další validace bude nutná u pacientů s nejasnou diagnózou.



# Rectal organoid morphology analysis (ROMA) as a promising diagnostic tool in cystic fibrosis

Senne Cuyx <sup>1,2</sup>, Anabela Santo Ramalho <sup>1</sup>, Nikky Corthout,<sup>3,4</sup> Steffen Fieuwis,<sup>5,6</sup> Eva Fürstová,<sup>7</sup> Kaline Arnauts,<sup>8,9</sup> Marc Ferrante,<sup>8,10</sup> Catherine Verfaillie,<sup>9</sup> Sebastian Munck,<sup>3,4</sup> Mieke Boon,<sup>1,2</sup> Marijke Proesmans,<sup>1,2</sup> Lieven Dupont,<sup>11,12</sup> Kris De Boeck,<sup>1,2</sup> François Vermeulen <sup>1,2</sup> On behalf of the Belgian Organoid Project

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Dr François Vermeulen,  
Department of Development  
and Regeneration, Woman and  
Child Unit, CF research lab,  
KU Leuven, Leuven, Flanders,  
Belgium;  
francois.vermeulen@uzleuven.  
be

Received 13 October 2020  
Revised 3 February 2021  
Accepted 9 March 2021  
Published Online First  
15 April 2021

## ABSTRACT

Diagnosing cystic fibrosis (CF) when sweat chloride is not in the CF range and less than 2 disease-causing *CFTR* mutations are found requires physiological *CFTR* assays, which are not always feasible or available. We developed a new physiological *CFTR* assay based on the morphological differences between rectal organoids from subjects with and without CF. In organoids from 167 subjects with and 22 without CF, two parameters derived from a semi-automated image analysis protocol (rectal organoid morphology analysis, ROMA) fully discriminated CF subjects with two disease-causing mutations from non-CF subjects ( $p < 0.001$ ). ROMA, feasible at all ages, can be centralised to improve standardisation.

## INTRODUCTION

The diagnosis of cystic fibrosis (CF), an autosomal recessive disease caused by CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene mutations, relies on abnormal ( $\geq 60$  mmol/L) sweat chloride concentration (SCC) and/or two disease-causing *CFTR* mutations, as defined by the CFTR2 database.<sup>1,2</sup> In some subjects either with CF compatible symptoms or after neonatal screening, the diagnosis cannot be confirmed nor excluded. For patients with only intermediately elevated (30–60 mmol/L) SCC and *CFTR* mutation(s) of varying or unknown clinical consequence, second-line diagnostic tests (nasal potential difference (NPD) and intestinal current measurements (ICM)) are advocated to further explore *CFTR* function and assist the diagnosis. These tests are not readily available nor feasible at all ages.<sup>1</sup>

Rectal organoids are 3D structures grown from intestinal stem cells in a mucosal sample obtained through rectal biopsy. *CFTR* protein expression is maintained in and determines the morphology of these organoids, inducing swelling of non-CF organoids through salt and water accumulation in the lumen surrounded by a cellular layer, while CF organoids have no lumen as described by the Beekman group.<sup>3,4</sup>

We quantified morphological differences to explore the ability of rectal organoid morphology analysis (ROMA) to differentiate organoids from subjects with a clear-cut diagnosis of CF from those of subjects without CF, giving proof of concept for ROMA as a diagnostic test for CF.

## METHODS

Organoids from a convenience cohort of 212 subjects were collected and imaged by one researcher blinded to subject characteristics. Twenty-three subjects were excluded due to low-quality images. Organoids of 167 subjects with CF and two disease-causing *CFTR* mutations<sup>2</sup> and 22 non-CF subjects were analysed (online supplemental file 1 and 2.1).

Rectal biopsies and organoid cultures were performed as previously described (online supplemental file 2.2).<sup>4</sup> No adverse events were reported. In total, 32 wells per subject were plated under basal conditions (no *CFTR* modulators nor forskolin added) and images of each well were acquired after overnight growth and calcein staining.

Two indices were calculated using imaging software (NIS-Elements AR Analysis 5.02.00) to quantify organoid morphology: the intensity ratio (IR) measures the presence or absence of a central lumen, and the circularity index (CI) quantifies the roundness of the organoids (figure 1 and online supplemental file 2.3).

Discriminant analysis was applied to differentiate between CF and non-CF subjects using IR and CI. Mann-Whitney and Fisher exact tests were used for between-group comparisons.

## RESULTS

The IR and CI differed ( $p < 0.001$ ) between CF and non-CF (table 1). Perfect discrimination (AUC=1) was obtained with a linear discriminant analysis (figure 2). Analysis of only eight wells chosen randomly out of the 32 showed almost identical results (AUC=1) (online supplemental file 2.4).

No correlation between ROMA indexes and age was found, nor differences in IR and CI between subjects with CF in the lowest versus three highest SCC quartiles ( $< 87$  and  $\geq 87$  mmol/L, respectively). The IR ( $p = 0.007$ ), but not CI ( $p = 0.419$ ), was different between PI (pancreatic insufficient) and PS (pancreatic sufficient) subjects with CF. For additional statistical analyses, see online supplemental files 2.4 and 3.

## DISCUSSION

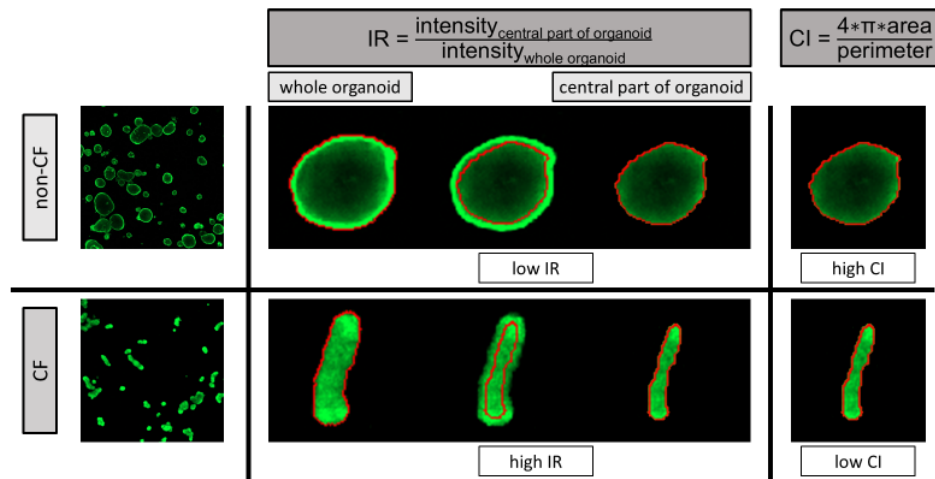
Both IR and CI, calculated with ROMA, discriminated subjects with clinical CF and two disease-causing *CFTR* mutations from non-CF subjects. This makes ROMA appealing as an additional



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

**To cite:** Cuyx S, Ramalho AS, Corthout N, et al. *Thorax* 2021;**76**:1146–1149.





**Figure 1** Images of rectal organoids from subjects without (upper panels) and with CF (lower panels). Illustration of the methods to calculate the two indexes, IR (intensity ratio; central panel) and CI (circularity index; right panel), used to quantify morphological differences between rectal organoids of subjects with and without CF. IR measures the presence or absence of a central lumen, calculated in three steps: (1) calculate the global fluorescence intensity of the organoids: erode 1 pixel (2.5  $\mu\text{m}$ ) to remove the surrounding 'halo' around each structure and measure the mean fluorescence intensity of the remaining whole organoid; (2) calculate the lumen fluorescence intensity of the organoids: erode 10 pixels from each structure to remove the cellular border from the organoids and measure the mean fluorescence intensity of the remaining structure; (3) IR is equal to (intensity central part of organoid)/(intensity whole organoid) and is higher in CF than in non-CF organoids. CI quantifies the roundness of the organoids, defined as  $(4 \times \pi \times \text{area})/\text{perimeter}$ , which is lower in CF than in non-CF organoids. CF, cystic fibrosis; IR, intensity ratio; CI, circularity index.

physiological CFTR assay to assist in the diagnosis of CF, with a discriminative ability comparable with that reported for SCC and other physiological CFTR assays such as NPD or ICM.<sup>5,6</sup>

Similarly to SCC,<sup>5</sup> mean IR is different between PS and PI subjects with CF, although not fully discriminative. Residual CFTR function, translating in pancreatic sufficiency, leads to the presence of a small lumen in the organoids and thus lower IR, without altering the organoids' irregular shape quantified by CI.

The current study is monocentric and needs replication, but samples have already been successfully received from

other Belgian and international centres. Before ROMA can be proposed as diagnostic test for CF, more data are needed, especially from patients with a clinical CF diagnosis but without two disease-causing *CFTR* mutations, and from prospective analysis in subjects with unresolved CF diagnosis, including infants with CF screening positive, inconclusive diagnosis (CFSPID). The absence of a gold standard will need to be taken into account, as with other CFTR physiological assays.

Rectal suction biopsy for ROMA can easily be performed in general hospitals with low complication rates,<sup>7</sup> even in infants (with CFSPID). Quality requirements for biopsies are lower for ROMA<sup>8</sup> than for ICM,<sup>9</sup> as only the presence of viable crypts is needed to grow an organoid culture, rather than an intact epithelium required for electrophysiology. Biopsies can thus be shipped to a central laboratory for analysis,<sup>8</sup> which ensures standardisation together with the semi-automated nature of the analysis.

Possible issues with ROMA include the complexity and cost of organoid culture. However, standardised protocols are available for organoid culture and technique portability has been demonstrated.<sup>8</sup> Reducing the number of wells from 32 to 8 resulted in virtually identical results and would make ROMA more cost-efficient. Using rectal instead of airway tissue is both an advantage (CFTR specific, no influence of disease state)<sup>1</sup> and a disadvantage (possible differences in CFTR function between organs). The delay of 1–2 months between taking the biopsy and availability of results is rarely an issue as these cases are often not urgent. This waiting time is similar to that of extensive genetic analysis.

Further work will have to assess ROMA as a diagnostic test in patients with equivocal diagnosis. Beyond diagnosis, organoids used for ROMA can be biobanked for later personalised medicine research for the newly diagnosed patients with CF.<sup>10</sup> ROMA could also contribute to measuring modulator efficiency, as restoring CFTR function to high levels causes the appearance,

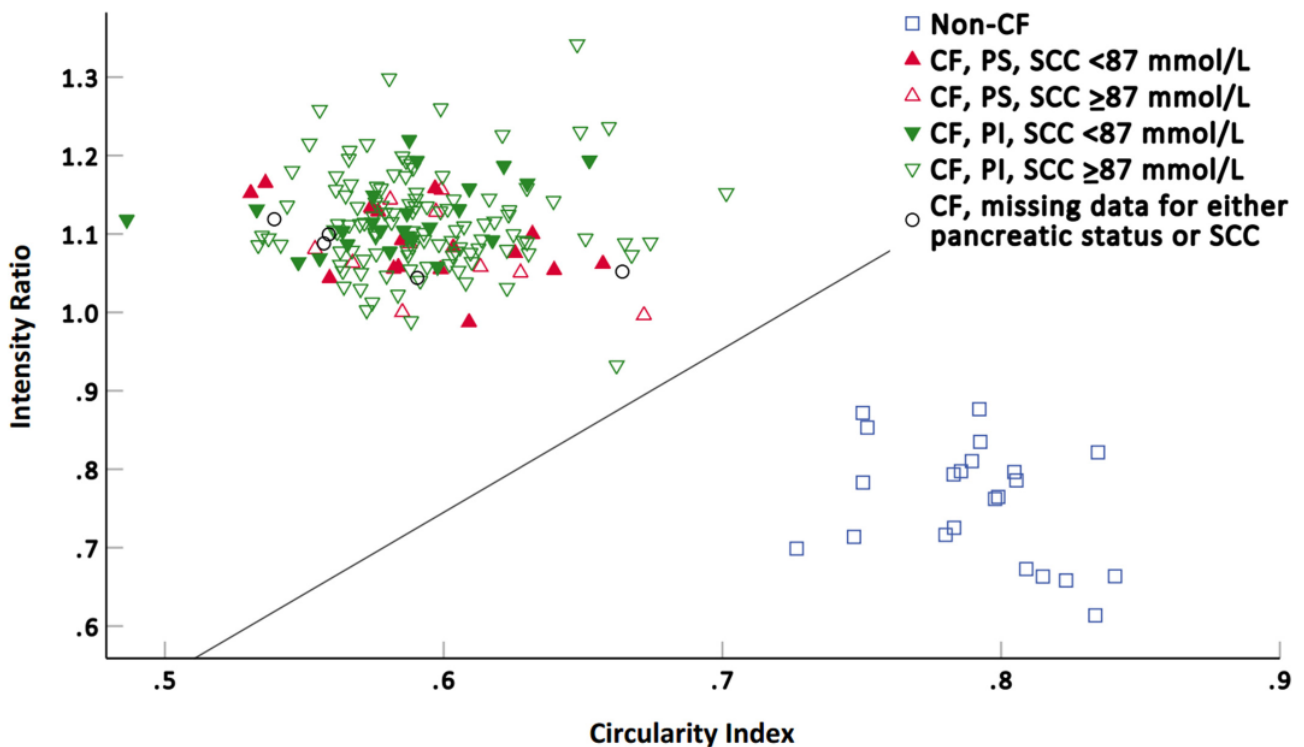
	CF	Non-CF	p value
n	167	22*	
IR	1.11 (0.93–1.34)	0.76 (0.61–0.88)	<0.001
CI	0.59 (0.49–0.70)	0.79 (0.73–0.84)	<0.001
Age (years)	18 (0–60)	44 (0–77)	<0.001
Gender	85 male (51%) 82 female (49%)	11 male (50%) 11 female (50%)	>0.999
SCC (mmol/L) (n=164)	97.61 (36–160)		
SCC low (<87 mmol/L) or high ( $\geq$ 87 mmol/L)	41 low (25%) 123 high (75%)		
Pancreatic status (n=165)	28 PS (17%) 137 PI (83%)		

n or mean and range.

\*7 carriers, 3 non-carriers, 2 autosomal dominant polycystic kidney disease, 6 ulcerative colitis, 1 polyp screening, 3 healthy controls included in a study about inflammatory bowel disease.

CF, cystic fibrosis; IR, intensity ratio; CI, circularity index; SCC, sweat chloride concentration; PI, pancreatic insufficient; PS, pancreatic sufficient





**Figure 2** Intensity ratio (IR) and circularity index (CI) values of each subject according to disease status, pancreatic status and sweat chloride concentration. The line represents the optimal discrimination line obtained by linear discriminant analysis. CF, cystic fibrosis; PI, pancreatic insufficient; PS, pancreatic sufficient; SCC, sweat chloride concentration.

before any stimulation, of a central lumen and swelling to a more round shape,<sup>3,4</sup> measured by IR and CI, respectively.

#### Author affiliations

<sup>1</sup>Department of Development and Regeneration, Woman and Child Unit, CF Research Lab, KU Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Pediatric Pulmonology, University Hospital of Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>3</sup>VIB Bio Imaging Core, VIB KU Leuven Center for Brain & Disease Research, Leuven, Belgium

<sup>4</sup>Department for Neuroscience, KU Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>5</sup>Interuniversity Center for Biostatistics and Statistical Bioinformatics, KU Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>6</sup>Interuniversity Center for Biostatistics and Statistical Bioinformatics, Hasselt University, Hasselt, Limburg, Belgium

<sup>7</sup>Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Motol University Hospital, Praha, Czech Republic

<sup>8</sup>Department of Chronic Diseases and Metabolism (CHROMETA), Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), KU Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>9</sup>Department of Development and Regeneration, Stem Cell Institute Leuven (SCIL), KU Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>10</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital of Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>11</sup>Department of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing; Pneumology, University Hospital of Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

<sup>12</sup>Department of Respiratory Diseases, University Hospital of Leuven, Leuven, Flanders, Belgium

**Acknowledgements** We thank the patients and parents who participated in this study. We thank Els Aertgeerts, Karolien Bruneel, Claire Collard, Liliane Collignon, Monique Delfosse, Anja Delporte, Nathalie Feyaerts, Cécile Lambremont, Lut Nieuwborg, Nathalie Peeters, Ann Raman, Pim Sansen, Hilde Stevens, Marianne Schulte, Els Van Ransbeek, Christel Van de Brande, Greet Van den Eynde, Marleen Vanderkerken, Inge Van Dijck, Audrey Wagener, Monika Waskiewicz and Bernard Wenderickx for logistic support. We also thank Stefan Joris and Dr. Jan Vanleeuwe from the Mucovereniging/Association Muco for their support.

**Collaborators** Belgian Organoid Project: Hedwige Boboli (CHR Citadelle, Liège, Belgium), Linda Boulanger (University Hospital Leuven, Belgium), Georges Casimir (HUDERF, Brussels, Belgium), Benedicte De Meyere (University Hospital Ghent, Belgium), Elke De Wachter (University Hospital Brussels, Belgium), Danny De Looze (University Hospital Ghent, Belgium), Isabelle Etienne (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Laurence Hanssens (HUDERF, Brussels), Christiane Knoop (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Monique Lequesne (University Hospital Antwerp, Belgium), Vicky Nowé (GZA St. Vincentius Hospital Antwerp), Dirk Staessen (GZA St. Vincentius Hospital Antwerp), Stephanie Van Biervliet (University Hospital Ghent, Belgium), Eva Van Braeckel (University Hospital Ghent, Belgium), Kim Van Hoorenbeeck (University Hospital Antwerp, Belgium), Eef Vanderhelst (University Hospital Brussels, Belgium), Stijn Verhulst (University Hospital Antwerp, Belgium), Stefanie Vincken (University Hospital Brussels, Belgium).

**Contributors** Conceptualisation: SC, ASR, FV and KDB. Methodology: SC, ASR, NC, SM, KDB and FV. Recruiting of CF subjects and collection of rectal biopsies: MB, MP, FV and LD. Recruiting of control subjects and collection of rectal biopsies: MB, MP, FV, LD, KA and MF. Culturing the organoids and performing the rectal organoid morphology analysis: SC, EF and ASR. Analysis of the results and figures preparation: SC, ASR, SF and FV. Writing—original draft: SC, ASR and FV. Writing—review and editing: SC, ASR, NC, SF, EF, KA, MF, CV, SM, MB, MP, LD, KDB, FV, HB, LB, GC, BDM, EDW, DDL, IE, LH, CK, ML, VN, DS, SVB, EVB, KVH, EV, SVE, SVI. Supervision: ASR, FV and KDB.

**Funding** This study was funded by the Belgian CF patients' association "Mucovereniging/Association Muco", the Research Grant of the Belgian Society of Paediatrics BVK-SBP 2019, and a grant from the UZ Leuven Fund for Translational Biomedical Research.

**Competing interests** None declared.

**Patient consent for publication** Not required.

**Ethics approval** Approval from the Ethical committee of UZ Leuven and informed consent from all subjects or representatives were obtained.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

#### ORCID iDs

Senne Cuyx <http://orcid.org/0000-0002-6473-8966>

Anabela Santo Ramalho <http://orcid.org/0000-0003-3143-3661>

François Vermeulen <http://orcid.org/0000-0003-2303-2470>

## REFERENCES

- De Boeck K, Vermeulen F, Dupont L. The diagnosis of cystic fibrosis. *La Presse Médicale* 2017;46:e97–108.
- CFTR2 [Internet]. Available: <https://www.cfr2.org/> [Accessed cited 2019 May 30].
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge HR, et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* 2013;19:939–45 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727931/>
- Dekkers JF, Berkers G, Kruisselbrink E, et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Sci Transl Med* 2016;8:344ra84 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27334259/>
- Wilschanski M, Dupuis A, Ellis L, et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:787–94 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16840743/>
- Derichs N, Sanz J, Von Kanel T, et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax* 2010;65:594–9 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627915>
- Friedmacher F, Puri P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. *Pediatr Surg Int* 2015;31:821–30 <https://link.springer.com/article/>
- Vonk AM, van Mourik P, Ramalho AS, et al. Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protoc* 2020;1:100019.
- Servidoni MF, Sousa M, Vinagre AM, et al. Rectal forceps biopsy procedure in cystic fibrosis: technical aspects and patients perspective for clinical trials feasibility. *BMC Gastroenterol* 2013;13:91.
- Ramalho AS, Fürstová E, Vonk AM. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of cystic fibrosis. *Eur Respir J [Internet]* 2020.



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

Na základě předchozí práce 4.4. a optimalizace metody ROMA jsme publikovali podrobný protokol v *Journal of Visualized Experiments*, ve kterém jsme podrobně popsali jednotlivé kroky od kultivace střevních organoidů, nasazení kultivačních destiček, provedení experimentu za využití konfokálního fluorescenčního mikroskopu, obrazovou analýzu pomocí zobrazovacího softwaru a následné vypočítání diskriminačních indexů IR a CI.

Na základě publikovaného protokolu by metoda měla být reprodukovatelná i v dalších laboratořích. V protokolu byla uvedena i naše předchozí analýza CF pacientů a zdravých kontrol, ze které vyplývá že ROMA spolehlivě rozlišuje mezi CF a non-CF organoidy (viz 4.4.).

# Rectal Organoid Morphology Analysis (ROMA): A Diagnostic Assay in Cystic Fibrosis

Senne Cuyx<sup>1,2</sup>, Anabela S. Ramalho<sup>1</sup>, Nikky Corthout<sup>3,4</sup>, Steffen Fieuids<sup>5</sup>, Eva Fürstová<sup>6</sup>, Kaline Arnauts<sup>7,8</sup>, Marc Ferrante<sup>7,9</sup>, Catherine Verfaillie<sup>8</sup>, Sebastian Munck<sup>3,4</sup>, Mieke Boon<sup>1,2</sup>, Marijke Proesmans<sup>1,2</sup>, Lieven Dupont<sup>10,11</sup>, Kris De Boeck<sup>1,2</sup>, François Vermeulen<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Development and Regeneration, Woman and Child Unit, CF research lab, KU Leuven <sup>2</sup> Department of Pediatrics, Pediatric Pulmonology, University Hospitals Leuven <sup>3</sup> VIB Bio Imaging Core, VIB-KU Leuven Center for Brain & Disease Research <sup>4</sup> Department for Neuroscience, KU Leuven <sup>5</sup> Interuniversity Center for Biostatistics and Statistical Bioinformatics, University of Leuven and University of Hasselt <sup>6</sup> Department of Pediatrics, <sup>7</sup> Department of Chronic Diseases and Metabolism (CHROMETA), Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), KU Leuven <sup>8</sup> Department of Development and Regeneration, Stem Cell Institute Leuven (SCIL), KU Leuven <sup>9</sup> Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospitals Leuven, KU Leuven <sup>10</sup> Department of Chronic Diseases, Metabolism and Ageing; Pneumology, KU Leuven <sup>11</sup> Department of Respiratory Diseases, University Hospitals Leuven

## Corresponding Author

Senne Cuyx

senne.cuyx@kuleuven.be

## Citation

Cuyx, S., Ramalho, A.S., Corthout, N., Fieuids, S., Fürstová, E., Arnauts, K., Ferrante, M., Verfaillie, C., Munck, S., Boon, M., Proesmans, M., Dupont, L., De Boeck, K., Vermeulen, F. Rectal Organoid Morphology Analysis (ROMA): A Diagnostic Assay in Cystic Fibrosis. *J. Vis. Exp.* (184), e63818, doi:10.3791/63818 (2022).

## Date Published

June 10, 2022

## DOI

10.3791/63818

## URL

jove.com/video/63818

## Abstract

Diagnosis of cystic fibrosis (CF) is not always straightforward, especially when sweat chloride concentration is intermediate and/or less than two disease-causing *CFTR* mutations can be identified. Physiological *CFTR* assays (nasal potential difference, intestinal current measurement) have been included in the diagnostic algorithm but are not always readily available or feasible (e.g., in infants). Rectal organoids are 3D structures that grow from stem cells isolated from crypts of a rectal biopsy when cultured under specific conditions. Organoids from non-CF subjects have a round shape and a fluid-filled lumen, as *CFTR*-mediated chloride transport drives water into the lumen. Organoids with defective *CFTR* function do not swell, retaining an irregular shape and having no visible lumen. Differences in morphology between CF and non-CF organoids are quantified in the 'Rectal Organoid Morphology Analysis' (ROMA) as a novel *CFTR* physiological assay. For the ROMA assay, organoids are plated in 96-well plates, stained with calcein, and imaged in a confocal microscope. Morphological differences are quantified using two indexes: The circularity index (CI) quantifies the roundness of organoids, and the intensity ratio (IR) is a measure of the presence of a central lumen. Non-CF organoids have a high CI and low IR compared to CF organoids. ROMA indexes perfectly discriminated 167 subjects with CF from 22 subjects without CF, making ROMA an appealing physiological *CFTR* assay to aid in CF diagnosis. Rectal biopsies can be routinely performed at all ages in most hospitals and tissue can be sent to a central lab for organoid culture and ROMA. In the future, ROMA might also be applied to test the efficacy of *CFTR* modulators *in vitro*. The aim

of the present report is to fully explain the methods used for ROMA, to allow replication in other labs.

## Introduction

Cystic fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene. The *CFTR* protein is a chloride and bicarbonate channel, ensuring hydration of several epithelia<sup>1</sup>. CF is a high-burden, life-shortening, multi-system disease, manifesting primarily as a respiratory disease, but also affecting the gastrointestinal tract, pancreas, liver, and reproductive tract<sup>2</sup>.

Disease-causing *CFTR* mutations lead to a decrease in the amount or function of *CFTR*, in turn causing mucus dehydration. More than 2,000 variants in the *CFTR* gene have been described<sup>3</sup>, of which only 466 have been thoroughly characterized<sup>4</sup>.

A diagnosis of CF can be made when either sweat chloride concentration (SCC) is above the threshold of 60 mmol/L or when two disease-causing *CFTR* mutations (according to the *CFTR2* database) are identified<sup>4,5</sup>. In subjects with only intermediately elevated (30-60 mmol/L) SCC, which occurs in about 4%-5% of sweat tests<sup>6</sup>, and *CFTR* mutations of varying or unknown clinical consequence, the diagnosis cannot be confirmed nor ruled out, even when they have CF compatible symptoms or a positive neonatal screening test. For these cases, second-line physiological *CFTR* assays (nasal potential difference (NPD) and intestinal current measurements (ICM)) have been included in the diagnostic algorithm. These tests are not readily available at most centers nor feasible at all ages, especially in infants<sup>5</sup>.

Rectal organoids are 3D structures grown from *Lgr5*(+) adult intestinal stem cells from intestinal crypts obtained through rectal biopsy<sup>7</sup>. Organoids are being used increasingly in biomedical research, such as testing modulator treatment in CF<sup>8</sup>. A viable biopsy can be obtained by either suction or forceps biopsy, a procedure that causes only minimal discomfort and is safe even in infants, with low complication rates<sup>9</sup>. The crypts isolated from the rectal biopsies are enriched in stem cells, and under specific culturing conditions, these self-organize into rectal organoids. The morphology of these organoids is determined by the expression and function of *CFTR*, located at the apical membrane of epithelial cells. Functional *CFTR* allows chloride and water to enter the organoid lumen, thereby inducing swelling of non-CF organoids. CF organoids do not swell and have no visible lumen<sup>10,11</sup>.

Rectal organoid morphology analysis (ROMA) allows the discrimination between CF and non-CF organoids based on these differences in organoid morphology. Non-CF organoids are more round and have a visible lumen, while the opposite is true for CF organoids. For this assay, patient-specific organoids are plated in 32 wells of a 96-well plate. After 1 day of growing, the organoids are stained with calcein green and imaged in a confocal microscope. The non-CF organoids show a more circular shape and a less fluorescent central part, as the lumen contains fluid and calcein stains only cells. These differences in morphology are quantified using two ROMA indexes: the circularity index (CI) quantifies the roundness of organoids, while the intensity ratio (IR) is a

measure of the presence or absence of a central lumen. In this report, we describe in detail the protocol to obtain these discriminative indexes, to allow replication of the technique.

## Protocol

For all procedures involving human tissue, approval by the Ethics Committee Research UZ/KU Leuven (EC research) was acquired. All research was performed with informed consent and/or assent from parents, representatives, and/or patients.

**NOTE:** All procedures involving rectal biopsies and organoids should be performed in a laminar flow to protect the researcher from any biological hazard and to minimize the risk of contamination of the cultures. As for any lab procedure, researchers should at all times wear lab coats, gloves, and safety goggles to manipulate samples.

### 1. Rectal biopsy, isolation of adult stem cells from crypts, and organoid culture

1. For this initial part of the protocol, including media production and usage, organoid culture, splitting, expansion, and freezing for biobanking, follow the two previously published protocols<sup>8,12</sup>.
2. In short, the following steps have to be taken:
  1. Take three to four rectal biopsies with a forceps or suction device and collect in a sterile container (e.g., 1.5 mL microcentrifuge tube) with the Ad-DF++ medium as described in the protocol mentioned above.
  2. Transport biopsies to a central lab on ice or at 4 °C. Transport to other centers is possible, and quality is not significantly affected even when transport takes up to 48 h. If transport is expected to take over 6 h,

use a 15 mL conical tube with 6 mL of Ad-DF+++ medium instead of a 1.5 mL microcentrifuge tube.

3. Wash the biopsies in cold PBS until the supernatant is clear to remove the debris and non-epithelial tissues such as fat tissue.
4. Incubate the biopsies with EDTA (final concentration 10 mM) to detach the crypts. Plate the crypts in a basement membrane matrix. Add broad-spectrum antibiotics (gentamicin 50 µg/mL and vancomycin 50 µg/mL) to the medium in the first week of culturing to prevent bacterial contamination.
5. When the crypts have budded and are closed and proliferated, perform mechanical splitting, usually after 7 days.
6. Split the resulting organoids approximately every 7 days. This way, expand the culture, freeze backup samples in a biobank, or use the organoids for assays.

### 2. Organoid plating for ROMA (day 1)

1. Mechanically split the organoids for plating
  1. Collect organoids from three well-grown wells from a 24-well plate by washing twice with cold Ad-DF++ + medium, collect them in a 1.5 mL microcentrifuge tube, and assess them under the microscope<sup>12</sup>.
  2. Ensure that organoids are viable and of high quality, which can usually be achieved after 5-7 days of growth after being split previously (**Figure 1**).
  3. Mechanically split the organoids according to the aforementioned protocol<sup>8,12</sup>. Repeat until the majority of the organoids, as assessed using the



brightfield microscope, are small enough compared to the initial observation.

4. Collect the smaller organoids, usually corresponding to the collection of about the top 4/5 of the organoid-medium solution in a new microcentrifuge tube, as big organoids sink to the bottom of the tube due to gravity and small organoids stay suspended in the upper part of the medium column.
  5. Centrifuge the sample of smaller organoids at 0.3 x 1000 g for 2 min and discard the medium.
  6. Dilute the pellet of smaller organoids in 130  $\mu$ L of 40%-50% basement membrane matrix (diluted with Ad-DF+++ medium<sup>12</sup>).
  7. Resuspend well using a 200  $\mu$ L micropipette.
2. Plate the organoids in a 96-well plate
    1. Using a 20  $\mu$ L pipette, plate organoids in 32 wells of a pre-warmed 96-well plate. Ensure that each well contains one 4  $\mu$ L drop of the organoid-matrix solution produced in the previous step.
    2. The organoids in the solution tend to form a pellet at the bottom of the tube due to gravity-dependent downwards displacement. To prevent this and ensure uniform plating, regularly resuspend the organoid-matrix solution using a 200  $\mu$ L micropipette (e.g., every time after plating four to eight wells).
    3. Plate each drop in the center of the well to prevent the drop from running toward the edges of the well, which would reduce image quality later.
    4. Aim for around 30 organoids per well (minimum 15, maximum 90) without overlapping organoids.
    5. Keep in mind that these organoids will have to be incubated overnight and will grow slightly during

this time, and might start overlapping if the plating density is too high.

6. Check plating density using a brightfield microscope with a 5x magnification objective after plating the first one or two wells.
  7. If the plating density is too high, dilute the organoid-matrix solution stepwise with the addition of the basement membrane matrix until the desired plating density is reached (**Figure 2**).
  8. After plating, gently tap the plate on a flat surface to ensure that the majority of organoids are in the same focal plane.
3. Incubate the plate
    1. Incubate the 96-well plate at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> during 8-10 min to allow gelation of the basement membrane matrix.
    2. Add 50  $\mu$ L of human colon organoid medium +/+<sup>12</sup> in each well and incubate overnight for 16-24 h.
    3. Add no forskolin nor CFTR modulators, so the organoids grow under basal conditions.

### 3. Organoid imaging using confocal microscopy (day 2)

1. Stain the organoids with calcein green
  1. Prepare a 1 mM stock solution of calcein green by adding 50  $\mu$ L of dimethylsulfoxide (DMSO) to one vial containing 50  $\mu$ g of calcein green.
  2. Prepare a working solution of calcein green by adding 1.2  $\mu$ L of the stock solution to 200  $\mu$ L of Ad-DF+++ (concentration 6  $\mu$ M).
  3. Add 5  $\mu$ L of this calcein mixture to each well of the 96-well plate in which organoids were plated

(final calcein concentration 0.6  $\mu\text{M}$ ). Do not touch and dislocate the matrix drop inside the well when performing this step.

4. Rotate and slightly tilt the plate with the lid on a few times to ensure homogenous distribution of the calcein green in the whole well.
  5. Incubate the plate again for 15-30 min at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to ensure staining of all organoids in the wells.
2. Transfer the plate to the confocal microscope
    1. Transfer the plate to the confocal microscope with an automated stage and integrated incubator. Ensure that the plate is well fixed in the plate holder.
    2. Incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> is optional but not necessary, given the short duration (about 10 min) of the imaging process.
  3. Focus on the organoids (**Figure 3**)
    1. Using the confocal microscope, determine the optimal x/y position and focus (z position) of the organoids in each well manually, and save these positions in the imaging software.
    2. The best focus implies the sharpest possible delineation of the organoids and visualization of the largest possible part of the organoid drop. If the distribution of the stain is not adequate, repeat steps 3.1.4 and 3.1.5 (incubate, for example, for an extra 5-10 min).
    3. Use live-cell imaging settings with emission at 488 nm and excitation at 515 nm (specific for visualization of calcein fluorescence) and a 5x LD magnification objective.

4. Acquire organoid pictures of the 32 wells with the confocal microscope (**Figure 3** and **Figure 4**).

1. Take images in a unidirectional way with a resolution of 1024 pixels x 1024 pixels (pixel size 2.5  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ ) and depth of 16 bits.
2. Choose the laser intensity and master gain for optimal visualization of morphological differences between CF and non-CF organoids (e.g., discrimination between a non-stained water-filled central lumen (if present) and a stained cellular border).

**NOTE:** Organoids will not be delineated correctly when the master gain and thus the fluorescence signal are too low; setting the master gain too high will result in images with organoids with homogenous very high signal intensity, preventing imaging of more subtle morphological differences (**Figure 2**).

3. Save one picture per well for all 32 wells in the microscope format and export them as TIFF files.

#### 4. Image analysis (**Figure 5**)

1. Load the TIFF files in the image analysis software.
2. Perform the first quality check based on exclusion criteria determined by the operator (**Figure 2**): many differentiated or dead structures or debris, inadequate plating density, too many (e.g., overlapping) or too few organoids, and inadequate fluorescence distribution (organoids not clearly delineated, background signal too high).

**NOTE:** This step can also be performed before exporting images as TIFF files in step 3.4.

3. Prepare images for analysis

1. Recalibrate images, so 1 pixel corresponds to 2.5  $\mu\text{m}$  x 2.5  $\mu\text{m}$ .
2. Create and open one Network Data (.ND) file of all 32 pictures for each organoid culture, enabling simultaneous analysis of all 32 pictures per subject.
4. Delineate the organoids
  1. Delineate structures using a lower intensity threshold of 4,500 and an upper threshold of 65,535 (**Smooth** and **Clean** functions off; **Fill Holes** function on; **Separate** function at x3).
 

**NOTE:** This delineates fluorescent structures, with **Fill Holes** including the lumen in the delineated structure if present.
5. Count the organoids
  1. Select all structures  $\geq 40 \mu\text{m}$ .
  2. Click the **Update ND Measurement** button (every time a measurement is needed); the counted organoids will be numbered.
 

**NOTE:** This equals the total number of organoids in the 32 wells, while small debris, such as dead cells, is excluded.
6. Measure intensity and circularity for calculation of the indexes
  1. Select all structures  $\geq 60 \mu\text{m}$  and count.
 

**NOTE:** This counts the organoids large enough to show morphology typical to either CF or non-CF. Organoids  $>40 \mu\text{m}$  and  $<60 \mu\text{m}$  are small and dense, both in non-CF and in CF.
  2. Remove all structures touching the borders of the picture. Do this to remove organoids that are not completely visible, as their morphology cannot be accurately quantified.
3. Erode 1 pixel (= 2.5  $\mu\text{m}$ ) from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure. This removes the halo of diffused calcein fluorescence surrounding the organoids.
4. Measure the mean intensity of each structure. This way, the mean fluorescence of the organoids is measured.
5. Select all structures  $\geq 60 \mu\text{m}$  again and remove all structures touching the borders.
6. Erode 10 pixels (= 25  $\mu\text{m}$ ) from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure.
 

**NOTE:** In non-CF organoids, this erodes the cellular border and leaves only the lumen. In CF organoids, this erodes the outer part of the organoid, which has roughly the same fluorescence as the inner part that remains.
7. Measure the mean intensity of each eroded structure. This way, the mean fluorescence of the central part of the organoids is measured.
8. Measure the circularity of each structure. This corresponds to the mean circularity of the organoids.
7. Perform the second quality check: exclusion criteria determined by the software. Exclude the set of pictures when less than 50% of organoids (defined as structures  $\geq 40 \mu\text{m}$ ) are  $\geq 60 \mu\text{m}$ , as enough organoids should be large enough to show morphology typical to either CF or non-CF. Also exclude when  $<500$  or  $>3,000$  organoids (defined as structures  $\geq 40 \mu\text{m}$ ) are present in the 32 wells.

## 5. Measure the indices in the imaging software (Figure 6)

1. Measure the circularity index (CI).



**NOTE:** This corresponds to the mean circularity measured in step 4.6, which is the mean circularity of all organoids in all 32 wells. CI quantifies the roundness of the organoids, defined as  $\frac{4 \cdot \pi \cdot \text{area}}{\text{perimeter}}$ , which is lower in CF than in non-CF organoids

2. Measure the intensity ratio (IR)

1. Calculate the IR by dividing the mean of the intensity measurement after eroding 25  $\mu\text{m}$  from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure by the mean of the intensity measurement after eroding 2.5  $\mu\text{m}$  from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure.

**NOTE:** IR measures the presence or absence of a central lumen. IR is equal to  $\frac{\text{intensity central part of organoid}}{\text{intensity whole organoid}}$ , and is higher in CF than in non-CF organoids.

3. Simplify the analysis process

1. Prepare a standard worksheet using spreadsheet software to automatically calculate these indices upon copying the data (**Figure 7**).
2. To calculate the IR:
  1. Take the intensity measurement after eroding 2.5  $\mu\text{m}$  from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure. Use the mean for the calculation (denominator).
  2. Take the intensity measurement after eroding 25  $\mu\text{m}$  from the border of each  $\geq 60 \mu\text{m}$  structure. Use the mean for the calculation (numerator).
3. To calculate the CI, take the circularity of all organoids in all wells. The mean corresponds to the CI.

**NOTE:** When analysis of large batches of images is required, the image analysis process as described in section 4 can be semi-automated, starting from the calibrated ND files and running a macro with all steps combined.

## Representative Results

Organoids from 212 subjects were collected during routine clinical visits. No adverse events occurred during or after the rectal biopsy procedure. Organoids were imaged by one researcher blinded to subject characteristics such as genotype and clinical information. Due to low-quality images, 23 subjects were excluded. Examples of successful and failed organoid cultures and image acquisition can be seen in **Figure 2**.

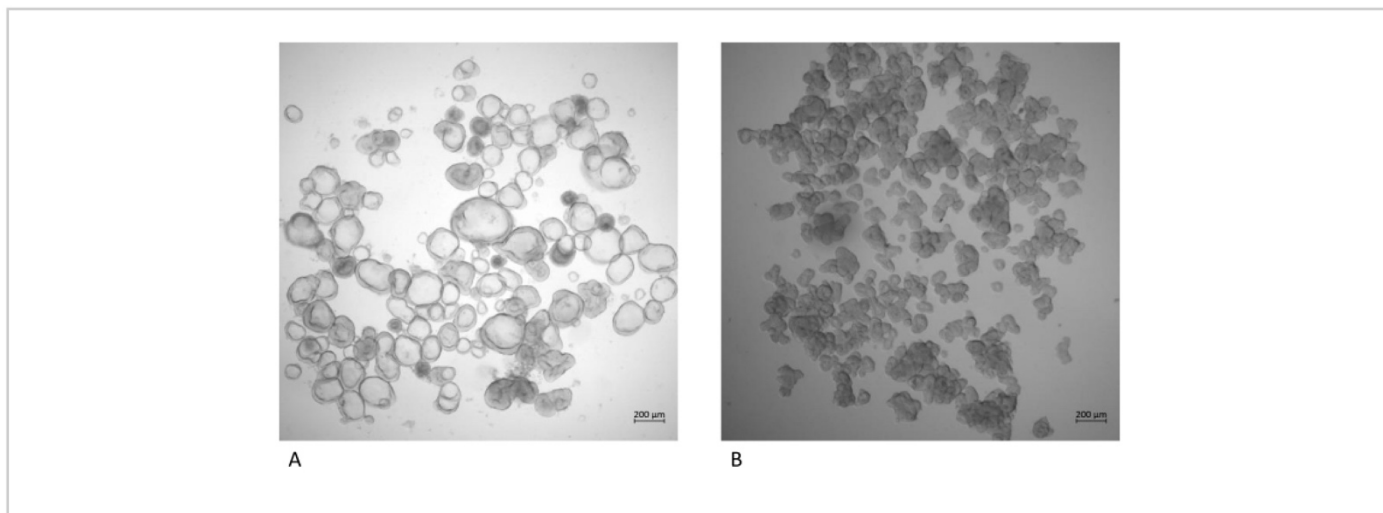
Organoids of 167 subjects with CF and two disease-causing *CFTR* mutations (as defined by the CFTR2 database<sup>4</sup>) and 22 non-CF subjects were analyzed. The mean amount of organoids per culture was 1,519 (about 40-50 organoids per well). The mean amount of organoids per culture included for analysis was 77% (the number of structures  $\geq 60 \mu\text{m}$  divided by the number of structures  $\geq 40 \mu\text{m}$ , corresponding to the fraction of organoids large enough to reflect typical CF or non-CF morphology).

The IR and CI discriminated ( $p < 0.001$ ) between organoids from subjects with and without CF (**Table 1**). With linear discriminant analysis, perfect discrimination (AUC = 1) was obtained between CF and non-CF, not only when using data from all 32 wells (**Figure 8**), but also when eight wells were chosen randomly for each culture (**Figure 9**).

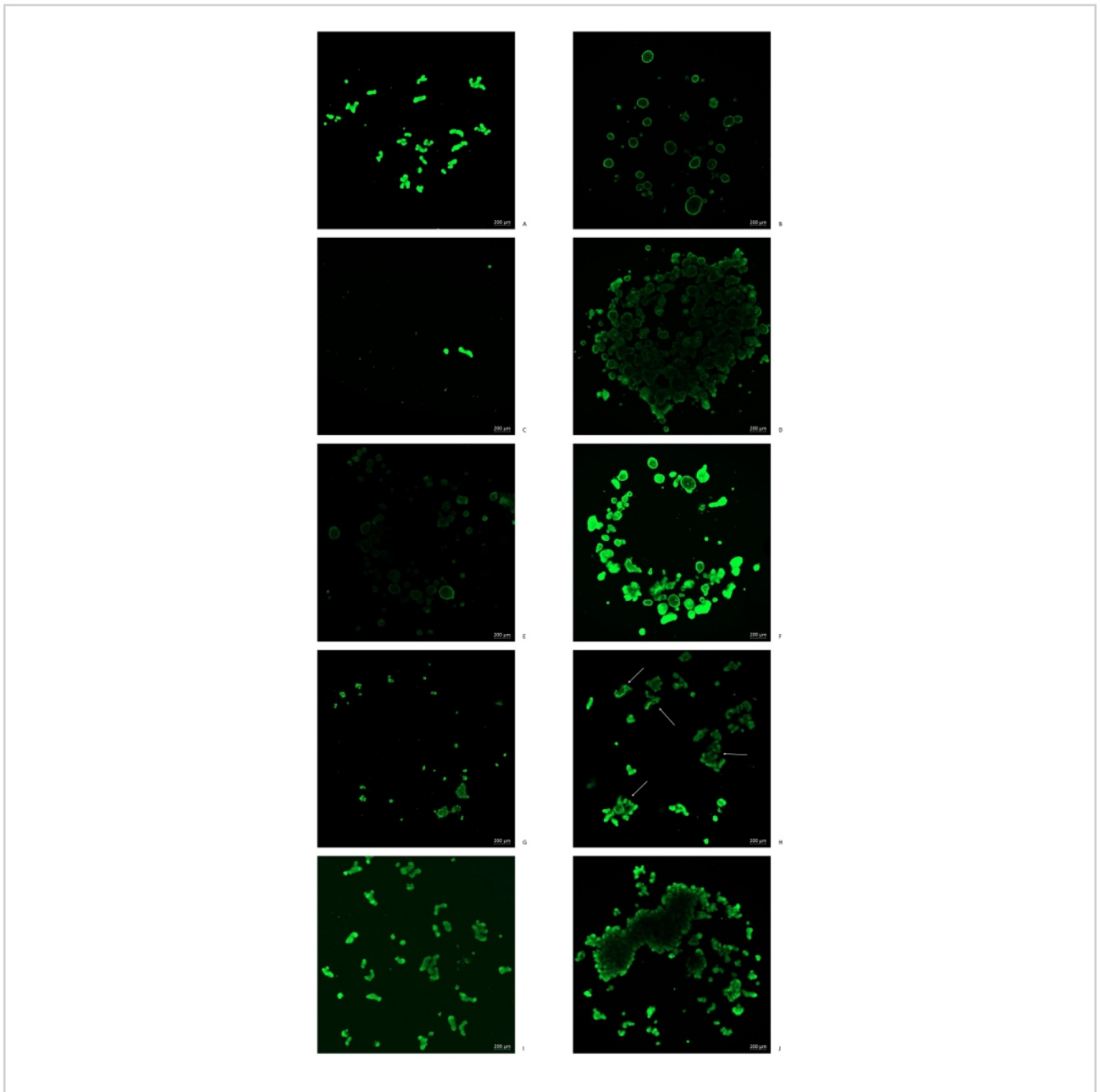
**Figure 10** depicts histograms showing the distribution of values for circularity, the intensity of the central part of the



organoid, and the intensity of the whole organoid for four illustrative cultures (two CF, two non-CF).



**Figure 1: Images of well-grown and viable organoids.** (A) Organoids from a person without CF and (B) organoids from a person with CF. Both cultures were grown for 7 days after the previous splitting. Images were made using a brightfield microscope with a 5x objective. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

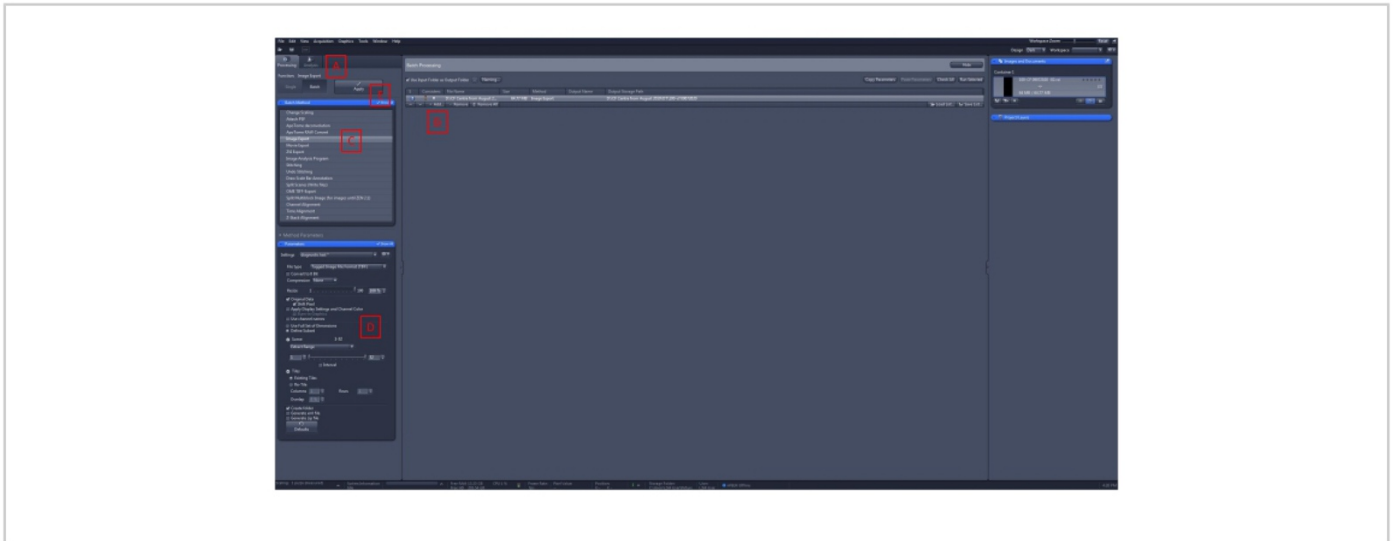


**Figure 2: Illustration of organoid imaging in the confocal microscope.** (A) Good quality CF organoids; (B) good quality non-CF organoids; (C) density of plating too low: not enough organoids for representative imaging; (D) density of plating too high: overlapping of organoids prevents adequate calcein staining and assessment of morphology; (E) intensity too low due to either a problem with calcein staining or the master gain setting being too low; (F) intensity too high due to the master gain

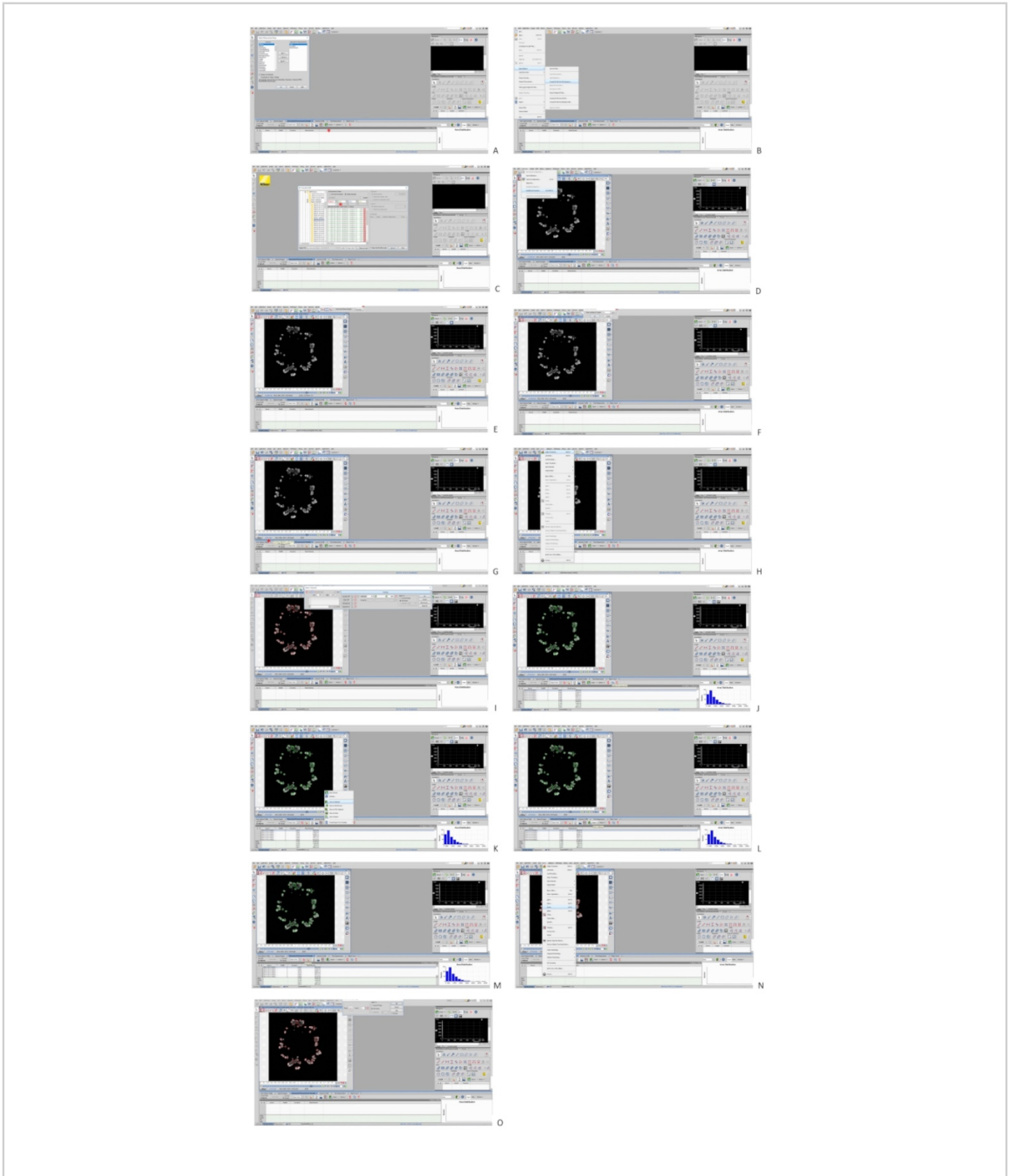
setting being too high: small lumens may be masked by the overexposed fluorescence signal; **(G)** dead and burst organoids, where separate cells can be seen and morphology cannot be assessed anymore; **(H)** differentiated organoids where stem cell status is lost, showing up as thick structures often with high fluorescence signals in the middle of the organoid structures, not reflecting typical CF or non-CF morphology; **(I)** background signal too high, either due to calcein staining having been performed too long ago with diffusion into the background or due to the master gain setting being too high; **(J)** insufficient mechanical splitting of organoids, leaving them too big for the assay, not staining well, and not adequately reflecting CF or non-CF morphology. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3: Focusing on organoids and acquiring pictures.** **(A)** Choose the **Acquisition** tab. Click on the **Live** button below for real-time imaging. **(B)** Use live cell imaging settings with emission at 488 nm. **(C)** Image at a resolution of 1024 pixels x 1024 pixels and a depth of 16 bits per pixel. Choose the unidirectional imaging parameter. **(D)** Adjust the master gain for the optimal intensity of fluorescence to optimize imaging of organoid characteristics such as shape and presence or absence of a lumen. **(E)** Save single positions (x, y, and z) for each of the 32 wells per organoid culture. **(F)** Click on the **Start Experiment** button to run the pre-defined protocol and acquire images according to the parameters chosen. **(G)** Images can be saved upon completion, or an autosave can be set up with the **Autosave** button. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

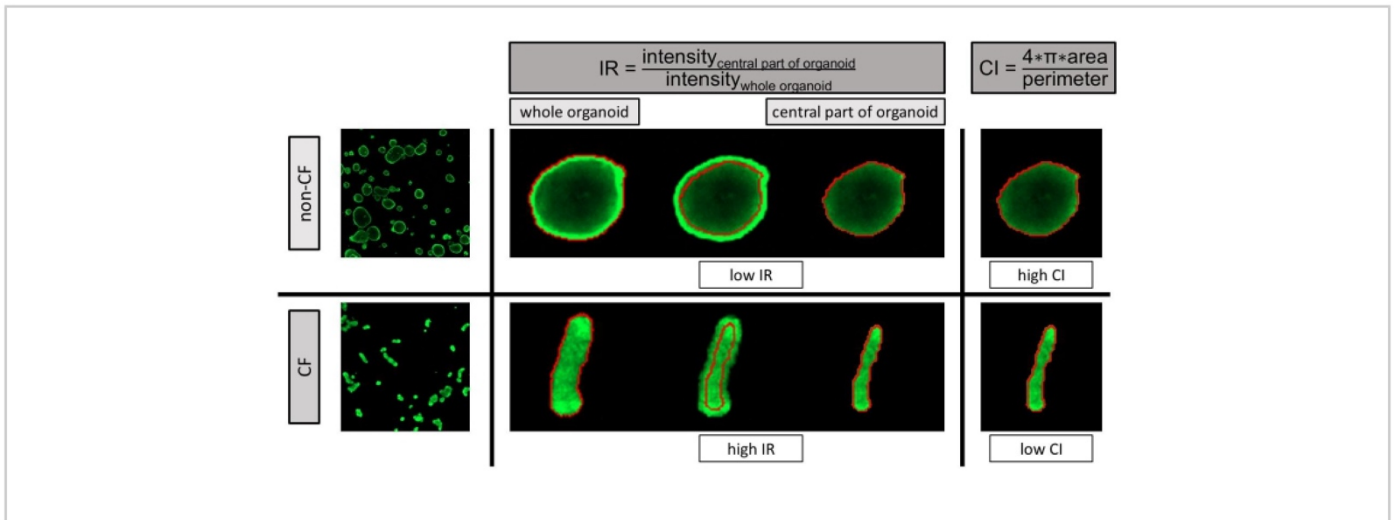


**Figure 4: Exporting images for analysis.** (A) Choose the **Processing** tab, and click on the **Batch** button to export images of multiple organoid cultures in one procedure. (B) Click on the **Add** button and select the saved images needed for analysis. (C) Select image export as the method. (D) Export images as TIFF files, do not convert to 8 bits, and do not compress or resize. Export original data without burn-in graphics. Select the 32 wells of the 96-well plate with the scene parameter. Do not re-tile. (E) Click on the **Apply** button to extract using the chosen parameters. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

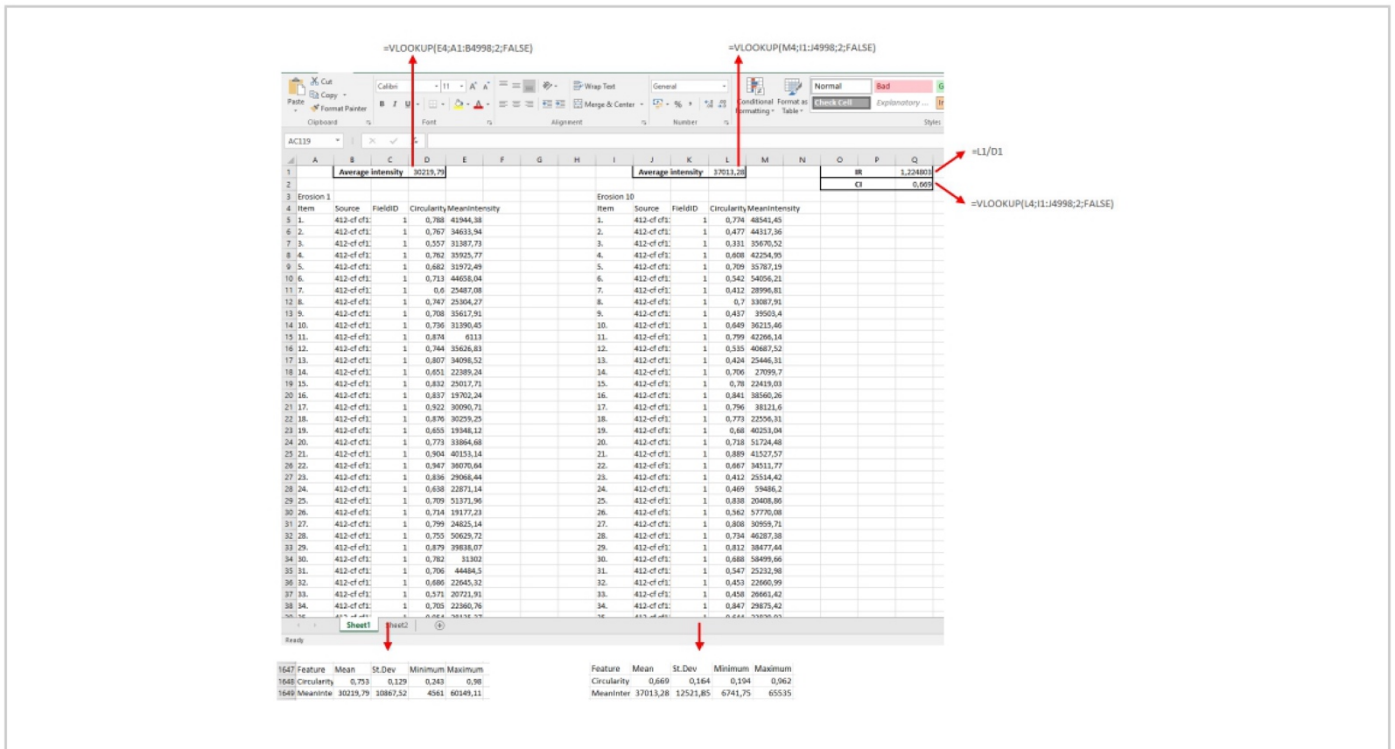


**Figure 5: Analysis of organoid images in the imaging software.** (A) Right-click the grey bar above the results section (red asterisk) to set up parameters for object measurement. Add circularity and mean intensity. (B) Click on **File > Import/Export > Create ND file from file sequence** to combine the TIFF files for one culture into one ND file. (C) Select the desired file and confirm; 32 pictures will be combined (red asterisk). (D) Click **Recalibration > Recalibrate Document**. (E) Click on **Pixel Size** in the pop-up window. (F) Input 2.5  $\mu\text{m}$  as the size of 1 pixel. (G) The picture will now be recalibrated to micrometers instead of pixels (red asterisk). (H) Click **Binary > Define Threshold**. (I) Size selection can be performed in the pop-up window. The minimum size is 40  $\mu\text{m}$  for organoid counting and 60  $\mu\text{m}$  for organoid morphology analysis. Always turn off the **Smooth** and **Clean** function, turn on the **Fill Holes** function, and input **Separate x3**. Apply to all frames. (J) The software will show delineation of the defined structures. Click on the **Update ND Measurement** button to analyze and get the chosen parameters from step A as output. (K) Click the downward facing arrow next to the export button and select data to the clipboard. (L) Click on the **Export** button to copy the data output to the clipboard. Data can now be pasted to a spreadsheet. (M) Click on the **Reset Data** button to empty the results section before a new measurement is performed. (N) When erosion has to be performed for intensity measurement for calculation of the intensity ratio, click **Binary > Erode**. The Remove Objects Touching Borders function can be found in the same drop-down menu. (O) Select the matrix shown in the figure for erosion, and choose the desired count (1 pixel or 2.5  $\mu\text{m}$  for removal of the halo surrounding organoids, 10 pixels or 25  $\mu\text{m}$  for removal of the cellular border surrounding a lumen if present). Please see the **Supplemental File** for full-screen panels of this figure. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

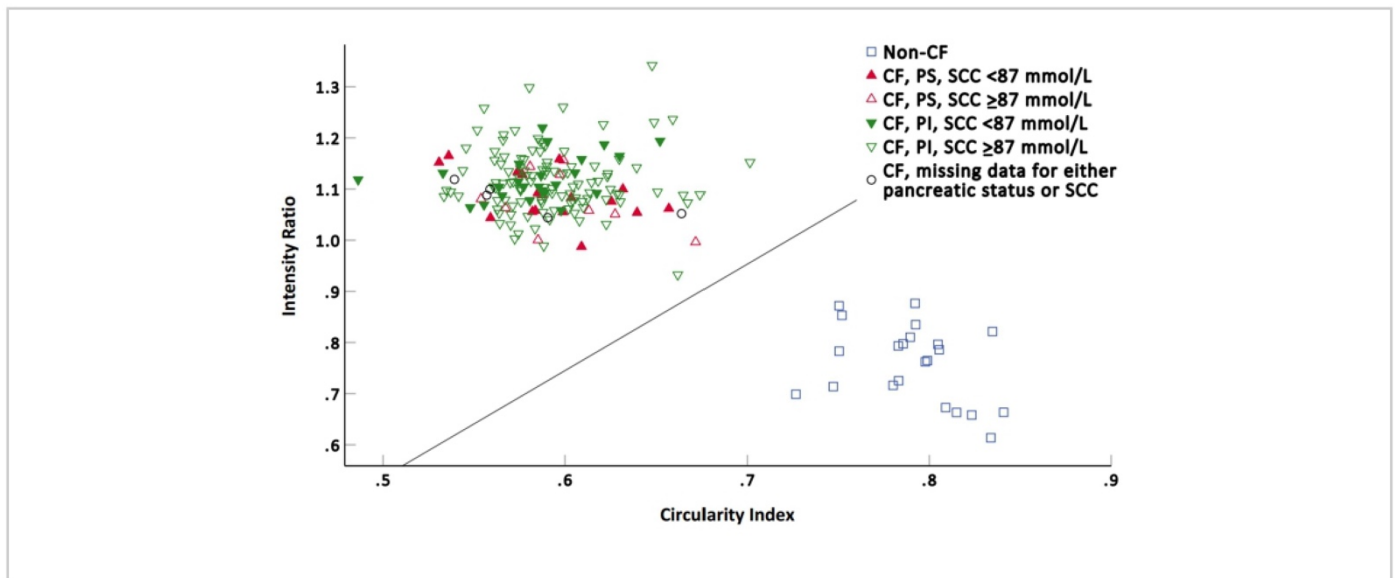




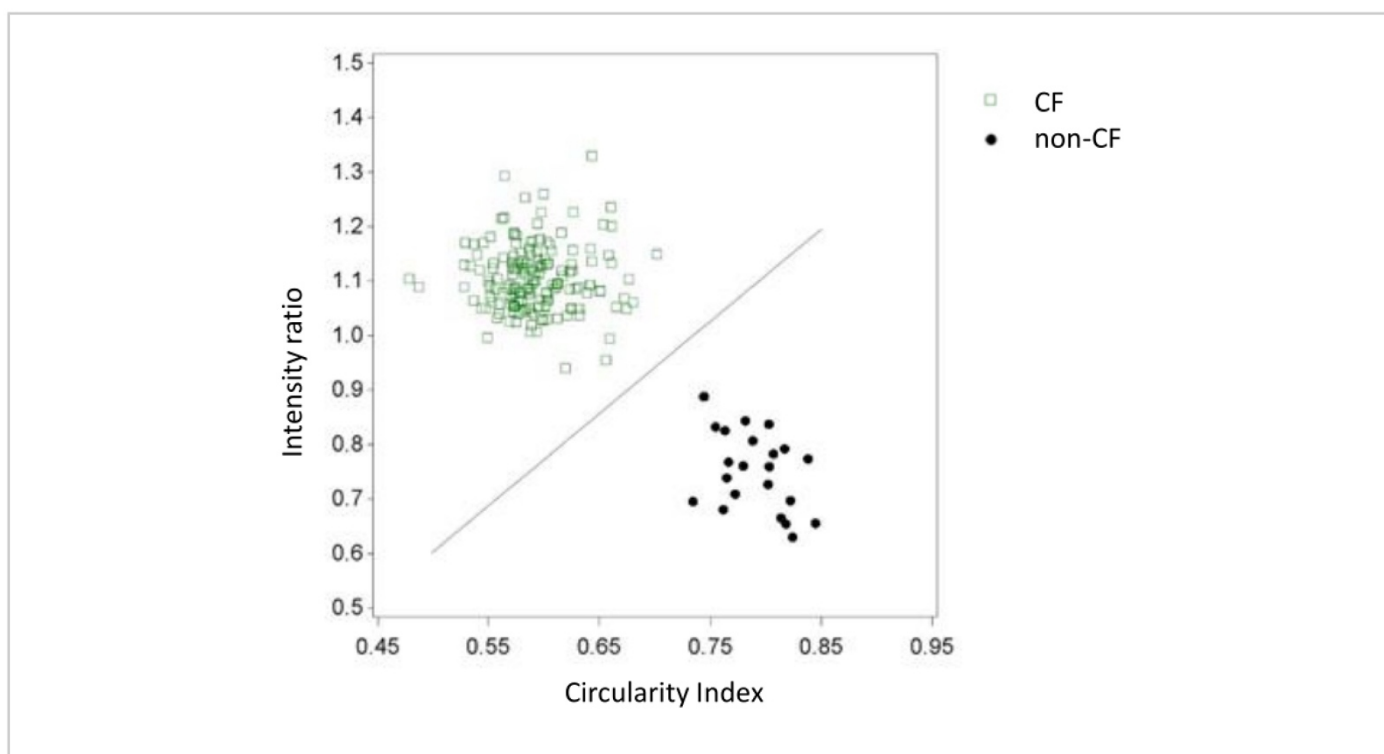
**Figure 6: Images of rectal organoids from people without (upper panels) and with CF (lower panels).** Illustration of the methods to calculate the two indexes, IR (intensity ratio; central panel) and CI (circularity index; right-hand panel), used to quantify morphological differences between rectal organoids of subjects with and without CF. IR measures the presence or absence of a central lumen, calculated in three steps: (I) calculate the global fluorescence intensity of the organoids: erode 1 pixel (2.5  $\mu\text{m}$ ) to remove the surrounding 'halo' around each structure, and measure the mean fluorescence intensity of the remaining whole organoid; (II) calculate the central fluorescence intensity of the organoids: erode 10 pixels (25  $\mu\text{m}$ ) around each structure to remove the cellular border from the organoids and measure the mean fluorescence intensity of the remaining structure; (III) IR is equal to  $\frac{\text{intensity central part of organoid}}{\text{intensity whole organoid}}$ , and is higher in CF than in non-CF organoids. CI quantifies the roundness of the organoids, defined as  $\frac{4 \cdot \pi \cdot \text{area}}{\text{perimeter}^2}$ , which is lower in CF than in non-CF organoids. CF: cystic fibrosis; IR: intensity ratio; CI: circularity index. This figure has been reprinted with permission from Cuyx et al.<sup>13</sup>. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



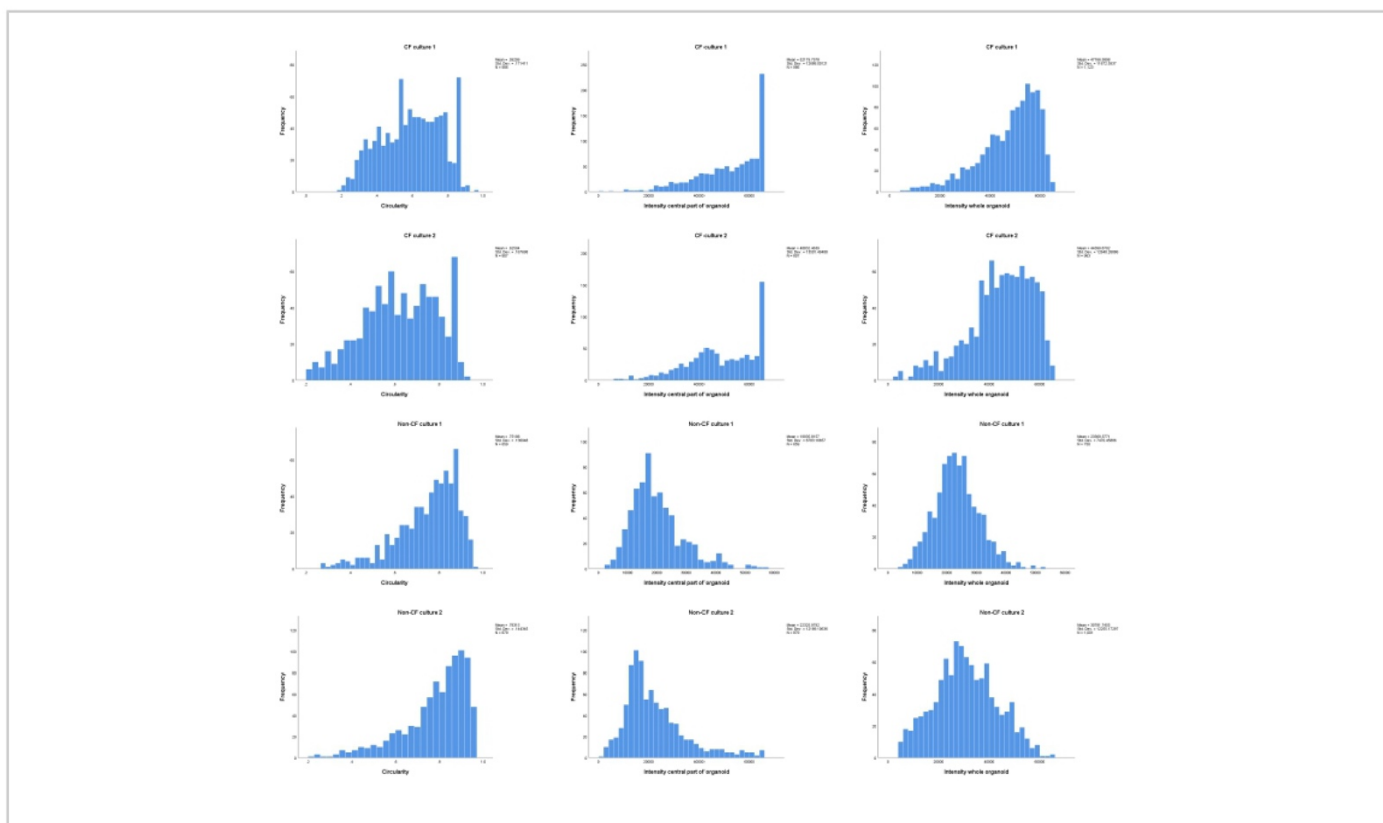
**Figure 7: Example of a spreadsheet for calculation of CI and IR.** The output (circularity and mean intensity, as defined in Figure 5) is copied into the spreadsheet for both erosion steps. The imaging software automatically adds the mean values for each parameter. These means can be copied into a cell of choice in the spreadsheet and then used for the calculation of CI and IR. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 8: Intensity ratio (IR) and circularity index (CI) values of each subject according to disease status, pancreatic status, and sweat chloride concentration.** The line represents the optimal discrimination line obtained by linear discriminant analysis. CF: cystic fibrosis; PS: pancreatic sufficient; PI: pancreatic insufficient; SCC: sweat chloride concentration. This figure has been reprinted with permission from Cuyx et al.<sup>13</sup>. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 9: Calculation of ROMA indexes.** Calculation of ROMA indexes using eight wells at random per subject and using the same statistical methodology was comparable to the results using 32 wells. Again, perfect discrimination was obtained. CI: circularity index; IR: intensity ratio. This figure has been reprinted with permission from Cuyx et al.<sup>13</sup>. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 10: Histograms illustrating the distribution of values measured in each single organoid in a given culture.**

The circularity parameter, the intensity parameter for the central part of the organoid, and the intensity parameter for the whole organoid are depicted (columns). Results in two CF and two non-CF cultures are shown (rows). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

**Supplemental File: Full-resolution presentation of Figure**

5. [Please click here to download.](#)

	CF	Non-CF	p-value
n	167	22*	
IR	1.11 (0.93–1.34)	0.76 (0.61–0.88)	<0.001
CI	0.59 (0.49–0.70)	0.79 (0.73–0.84)	<0.001
Age (years)	18 (0–60)	44 (0–77)	<0.001
Gender	85 male (51%) 82 female (49%)	11 male (50%) 11 female (50%)	>0.999

SCC (mmol/l) (n = 164)	97.61 (36–160)		
SCC low (<87 mmol/L) or high (≥87 mmol/L)	41 low (25%) 123 high (75%)		
Pancreatic status (n = 165)	28 PS (17%) 137 PI (83%)		

**Table 1: Baseline characteristics of the subjects and indexes calculated using rectal organoid morphology analysis (ROMA).** n or mean and range. CF: cystic fibrosis; IR: intensity ratio; CI: circularity index; SCC: sweat chloride concentration; PI: pancreatic insufficient; PS: pancreatic sufficient. \*seven carriers, three non-carriers, two autosomal dominant polycystic kidney disease, six ulcerative colitis, one polyp screening, three healthy controls included in a study about inflammatory bowel disease. This table has been reprinted with permission from Cuyx et al.<sup>13</sup>.

## Discussion

We provide a detailed protocol for rectal organoid morphology analysis (ROMA). The two indexes calculated with ROMA, IR, and CI, distinguished organoids from subjects with CF from those without CF with perfect accuracy. ROMA could thus function as a novel physiological CFTR assay complementary to SCC and other currently available tests<sup>13, 14, 15</sup>.

The protocol is dependent on the use of intestinal organoids, which have a round shape and central lumen when CFTR is functional, as described before<sup>10, 11</sup>. Organoids are used increasingly in the assessment of novel CF treatments (e.g., in the FIS assay<sup>8</sup>). The ROMA protocol can be integrated with the FIS assay protocol, as for the FIS assay 32 wells are incubated overnight without correctors. These wells can be imaged after the addition of calcein green but before the addition of forskolin and/or potentiators. This way, one 96-well plate can be used for both diagnostic and personalized therapeutic research for each specific patient. Apart from diagnosis, ROMA might also provide information in the characterization of variants of unknown significance.

The biggest practical hurdle of this protocol would probably be the startup of intestinal organoid cultures. However, in most general hospitals, rectal suction biopsies can be obtained according to a standardized protocol and with low complication rates, even in infants<sup>9</sup>. Generating organoids from biopsies requires only the presence of intestinal crypts, while for ICM, full-thickness biopsies of higher quality are necessary<sup>12, 15</sup>. Biopsies can be transported to a central lab for generating an organoid culture, and subsequent ROMA using the standardized and semi-automated protocol described herein<sup>9, 12</sup>. As reduction from 32 wells to eight wells for ROMA showed no difference in the classification of cases as CF or non-CF, plating eight wells for analysis would be sufficient, thus reducing the cost.

For further validation, ROMA will have to be performed on subjects with equivocal diagnoses. Organoids can be stored in a biobank for later research into personalized medicine for those diagnosed with CF<sup>16</sup>. ROMA could play a role in a personalized medicine approach as well. For example, IR could detect the appearance of a central lumen after



incubating organoids of subjects with residual CFTR function but before stimulation with a potentiator and forskolin.

## Disclosures

This study was funded by the Belgian CF patients' association "Mucovereniging/Association Muco", the Research Grant of the Belgian Society of Paediatrics BVK-SBP 2019, and a grant from the UZ Leuven Fund for Translational Biomedical Research. The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

We thank the patients and parents who participated in this study. We thank Abida Bibi for all culturing work with the organoids. We thank Els Aertgeerts, Karolien Bruneel, Claire Collard, Liliane Collignon, Monique Delfosse, Anja Delporte, Nathalie Feyaerts, Cécile Lambremont, Lut Nieuwborg, Nathalie Peeters, Ann Raman, Pim Sansen, Hilde Stevens, Marianne Schulte, Els Van Ransbeeck, Christel Van de Brande, Greet Van den Eynde, Marleen Vanderkerken, Inge Van Dijck, Audrey Wagener, Monika Waskiewicz, and Bernard Wenderickx for logistic support. We also thank the Mucovereniging/Association Muco, and specifically Stefan Joris and Dr. Jan Vanleeuwe, for their support and financing. We thank all collaborators from the Belgian Organoid Project: Hedwige Boboli (CHR Citadelle, Liège, Belgium), Linda Boulanger (University Hospitals Leuven, Belgium), Georges Casimir (HUDERF, Brussels, Belgium), Benedicte De Meyere (University Hospital Ghent, Belgium), Elke De Wachter (University Hospital Brussels, Belgium), Danny De Looze (University Hospital Ghent, Belgium), Isabelle Etienne (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Laurence Hanssens (HUDERF, Brussels), Christiane Knoop (CHU Erasme, Brussels, Belgium), Monique Lequesne (University Hospital Antwerp, Belgium), Vicky Nowé (GZA St. Vincentius Hospital Antwerp),

Dirk Staessen (GZA St. Vincentius Hospital Antwerp), Stephanie Van Biervliet (University Hospital Ghent, Belgium), Eva Van Braeckel (University Hospital Ghent, Belgium), Kim Van Hoorenbeeck (University Hospital Antwerp, Belgium), Eef Vanderhelst (University Hospital Brussels, Belgium), Stijn Verhulst (University Hospital Antwerp, Belgium), Stefanie Vincken (University Hospital Brussels, Belgium).

## References

1. Riordan, J. R. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. **245** (4922), 1066-1073 (1989).
2. Castellani, C. et al. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis*. **17** (2), 153-178 (2018).
3. *Cystic Fibrosis Mutation Database*. at <<http://www.genet.sickkids.on.ca/>> (2022).
4. *CFTR2*. at <<https://www.cftr2.org/>> (2022).
5. Farrell, P. M. et al. Diagnosis of cystic fibrosis: Consensus guidelines from the cystic fibrosis foundation. *The Journal of Pediatrics*. **181**, S4-S15 (2017).
6. Vermeulen, F., Lebecque, P., De Boeck, K., Leal, T. Biological variability of the sweat chloride in diagnostic sweat tests: A retrospective analysis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*. **16** (1), 30-35 (2017).
7. Sato, T. et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. **141** (5), 1762-1772 (2011).
8. Boj, S. F. et al. Forskolin-induced swelling in intestinal organoids: An in vitro assay for assessing drug

- response in cystic fibrosis patients. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. **120**, 55159 (2017).
9. Friedmacher, F., Puri, P. Rectal suction biopsy for the diagnosis of Hirschsprung's disease: a systematic review of diagnostic accuracy and complications. *Pediatric Surgery International*. **31** (9), 821-830 (2015).
  10. Dekkers, J. F. et al. A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nature Medicine*. **19** (7), 939-945 (2013).
  11. Dekkers, J. F. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Science Translational Medicine*. **8** (344), 344ra84 (2016).
  12. Vonk, A. M. et al. Protocol for application, standardization and validation of the forskolin-induced swelling assay in cystic fibrosis human colon organoids. *STAR Protocols*. **1** (1), 100019 (2020).
  13. Cuyx, S. et al. Rectal organoid morphology analysis (ROMA) as a promising diagnostic tool in cystic fibrosis. *Thorax*. **76** (11), 1146-1149 (2021).
  14. Wilschanski, M. et al. Mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator gene and in vivo transepithelial potentials. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. **174** (7), 787-794 (2006).
  15. Derichs, N. et al. Intestinal current measurement for diagnostic classification of patients with questionable cystic fibrosis: validation and reference data. *Thorax*. **65** (7), 594-599 (2010).
  16. Ramalho, A. S. et al. Correction of CFTR function in intestinal organoids to guide treatment of Cystic Fibrosis. *European Respiratory Journal*. **57**, 1902426 (2020).

## 6 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.

V rámci svého PhD studia autorka absolvovala roční stáž v etablované laboratoři tkáňových kultur KU Leuven v Belgii, kde si osvojila metody kultivace střevních organoidů, analýzu *in vitro* odpovědi na CFTR modulátory pomocí FIS a podílela se na vývoji diagnostické metody ROMA. Následně se v ČR významnou měrou podílela na založení a definování výzkumných směrů Laboratoře tkáňových kultur při Pediatrické klinice a Ústavu lékařské mikrobiologie 2.LF UK a FN Motol. Zahájila a prováděla odběry rektálních biopsií u všech pacientů zařazených do našich studií, optimalizovala kultivaci střevních organoidů v naší laboratoři, prováděla FIS vyšetření. Autorka sama psala odborné publikace, kde je uvedena jako první autor, prováděla část laboratorní práce a FIS vyšetření, hodnotila a interpretovala všechny výsledky. U spoluautorských publikací přispěla laboratorní prací – kultivací organoidů, přípravou experimentů a prováděním a analýzou FIS. Sekvence *CFTR* genu a hodnocení genetických výsledků bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol.

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.

## 7 SHRNU TÍ

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 popsaným 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 rozdílů v intenzitě fluorescence a přítomnosti lumen organoidů, a tvaru organoidů jsme vypočítali dva indexy: IR (intensity ratio, poměr intenzity) 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.

## 8 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 (FEV<sub>1</sub>, 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.



## 9 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 therotyping: 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 elexacaftor-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.