

УДК [577.161.2:616.43/45]:616-056.7

Оценка функции CFTR канала и ответов на модуляторы для пациентов с муковисцидозом, в генотипе которых присутствует патогенный вариант F508del

© 2020 Н.В. БУЛАТЕНКО^{1*}, А.С. ЕФРЕМОВА¹, Т.Б. БУХАРОВА¹, Н.В. ПЕТРОВА¹,
Н.Ю. КАШИРСКАЯ¹, Ю.Л. МЕЛЬЯНОВСКАЯ¹, Р.А. ЗИНЧЕНКО¹, Е.И. КОНДРАТЬЕВА¹,
Д.В. ГОЛЬДШТЕЙН¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», (ФГБНУ «МГНЦ»), Москва, 115478

*e-mail: bnv695@gmail.com

Поступила в редакцию 20.03.2020 г.

После доработки 14.04.2020 г.

Принята к публикации 07.07.2020 г.

Получение кишечных органоидов из ректальных биоптатов пациентов с муковисцидозом является высокочувствительным персонализированным методом оценки функциональной активности CFTR-канала и эффективности таргетных препаратов. Исследования были проведены для трех пациентов, в генотипе которых присутствует патогенный вариант F508del, и одного здорового гетерозиготного носителя патогенного варианта F508del. Было показано, что генотип F508del/F508del (два пациента) поддается эффективной коррекции CFTR-модуляторами (VX-770 и VX-809). При генотипе W361X/F508del модуляторы не оказывают существенного действия на восстановление функции хлорного канала CFTR. Функциональная активность CFTR у гетерозиготного носителя варианта F508del высокая и соответствует здоровому контролю.

Ключевые слова: муковисцидоз, кишечные органоиды, генетический вариант F508del, генотип, форсколиновый тест, CFTR модуляторы

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-69-73

Белок регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) функционирует как анионный канал в эпителиальных клетках многих органов, включая легкие, кишечник и поджелудочную железу. Муковисцидоз (МВ) обусловлен дефектами гена *CFTR*. Заболевание является моногенным, с варьирующим клиническим проявлением [1]. Средняя продолжительность жизни у людей с диагнозом «муковисцидоз» в большинстве стран не превышает 40 лет. Средний возраст наблюдаемых пациентов с МВ по данным Национального Регистра за 2017 год составляет 12 лет [2]. На сегодняшний день идентифицировано свыше 2000 вариантов последовательности гена *CFTR* [1], для большинства из них классификация затруднена, поскольку часто мутации

гена *CFTR* приводят к нескольким функциональным дефектам. Трехнуклеотидная делеция F508del (с.1521_1523delCTT, p.Phe508del) является наиболее распространенным вариантом, в мире на него приходится ~90% всех патогенных аллелей гена *CFTR* [3]. Он отнесен ко II классу согласно классификации патогенных вариантов, основанной на механизме нарушения функции хлорного канала CFTR [4], и в первую очередь вызывает нарушение фолдинга и переноса белка CFTR к апикальной мембране. Малая доля белка F508del-CFTR, которая всё же достигает апикальной мембраны, имеет пониженную стабильность [5]. Кроме того, данная мутация изменяет структуру мРНК CFTR и снижает эффективность трансляции [6]. Таким образом, F508del обычно относят ко II классу, однако

Список сокращений: КО – кишечные органоиды, МВ – муковисцидоз, CFTR – трансмембранной регулятор проводимости при муковисцидозе, FIS (форсколин-индуцированное набухание) – форсколиновый тест, Fsk – форсколин.

дополнительные исследования показали, что данный генетический вариант можно отнести, по меньшей мере, к двум дополнительным классам.

С 2012 г. для терапии МВ используют таргетные препараты. Сейчас официально зарегистрировано 4 препарата: ivacaftor (Kalydeco®), lumacaftor/ivacaftor (Orkambi®), tezacaftor/ivacaftor (Symdeko®) и elexacaftor/tezacaftor/ivacaftor (Trikafta™). Потенциатор VX-770 (ivacaftor) стал первым разработанным препаратом, который воздействует на основную причину заболевания. Потенциатор взаимодействует непосредственно с белком CFTR на мембране и увеличивает его проводимость. Еще один CFTR модулятор – корректор VX-809 (lumacaftor), он действует по другому механизму, способствует правильному фолдингу белка и его переносу на клеточную мембрану. Для терапии пациентов с МВ, гомозигот по варианту F508del, используют комбинированный препарат, сочетающий корректор VX-809 и потенциатор VX-770 (lumacaftor/ivacaftor) [7].

Новейшие достижения в области культивирования взрослых стволовых клеток привели к появлению уникальной биологической модели на основе кишечных органоидов. Эти эпителиальные трехмерные (3D) культуры повторяют структуру и функциональные свойства ткани *in vivo*. При помощи форсколинового теста (forskolin-induced swelling – FIS) – на кишечных органоидах осуществляют персонализированную оценку остаточной функции канала CFTR и подбор таргетной терапии [8, 9]. В данном исследовании проведена оценка функциональной активности канала CFTR и эффективности действия модуляторов при помощи форсколинового теста на кишечных органоидах у 3 пациентов и здорового ребенка, в генотипе которых обнаружен F508del вариант.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования были проведены для 3-х детей, больных МВ, и одного здорового ребенка: 1-й и 2-й – это гомозиготы по варианту F508del, 3-й пациент с генотипом F508del/W361X (с.[1521_1523delCTT]; [1083G> A], р.[Phe508del]; [Trp361*]), а в генотипе 4-го ребенка была обнаружена только одна мутация F508del в гетерозиготном состоянии (второй аллель методом секвенирования не идентифицирован, а диагноз МВ был полностью исключен). В качестве контроля использовали ранее полученные культуры КО от здоровых добровольцев.

За основу были взяты протоколы, разработанные под руководством Д. Бекмана в Лаборатории молекулярных исследований муковисцидоза

Университетского медицинского центра Утрехта в Нидерландах [8–11] и адаптированные в лаборатории ФГБНУ «МГНЦ» [12]. Все этапы культивирования проводили при 37 °С и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе (NU-437 400E, Nuair, США). Из материала, полученного при помощи ректальной биопсии, были выделены крипты и помещены в Matrigel (Corning, США). Matrigel полимеризовали в течение 40 мин при 37 °С и затем добавляли многокомпонентную культуральную среду, состоящую из Advanced DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 1% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия), 10 ммоль/л HEPES («ПанЭко»), GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), B27 (Life Technologies: Gibco, США), 1,25 мМ N-ацетилцистеина (Sigma-Aldrich, США), 50 нг/мл mEGF (Prospec, Израиль), 300 нг/мл hR-Spondin-3 (Peprotech, США), 10 мМ никотинамида (Sigma-Aldrich, США), 500 нмоль/л A83-01 (Tocris Bioscience, Bristol, Великобритания), 10 мкмоль/л SB202190 (Sigma-Aldrich), 1% примоцина (InvivoGen, США), 50% Wnt3-кондиционированной и 10% Noggin-кондиционированной среды. Среду обновляли каждые 2–3 дня, а органоиды пассировали в соотношении 1:4 каждые 6–7 сут.

Для проведения FIS применяли стандартную культуральную среду, состоящую из Advanced DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific), 1% GlutaMAX-1 (Thermo Fisher Scientific), 1% HEPES («ПанЭко»), 1% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко») и 1% примоцина (Invitrogen). КО высевали на 96-луночные планшеты. Через 24 ч органоиды прижизненно окрашивали 0,84 мкМ Calcein AM в течение 1 ч и проводили стимуляцию форсколином (концентрация 5 мкМ). Корректор VX-809 (5 мкМ) добавляли на стадии посева, а потенциатор VX-770 (5 мкМ) – одновременно с форсколином. Через определенные интервалы времени (0, 20, 40 и 60 мин) проводили съемку «фиксированных» полей на объективе х5 с использованием флуоресцентного микроскопа Observer D1 (Zeiss, Германия). Количественный анализ набухания органоидов проводили при помощи программ Image J, Microsoft Excel 2007 и Sigma Plot 12.5. При построении графика рассчитывали площадь под кривой зависимости объема органоидов от времени (AUC - area under the curve).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Культуры органоидов пациентов 1–3, в отличие от контроля с функциональным CFTR, характеризуются сильно редуцированной внутренней полостью и неправильной формой (рис. 1). Эти

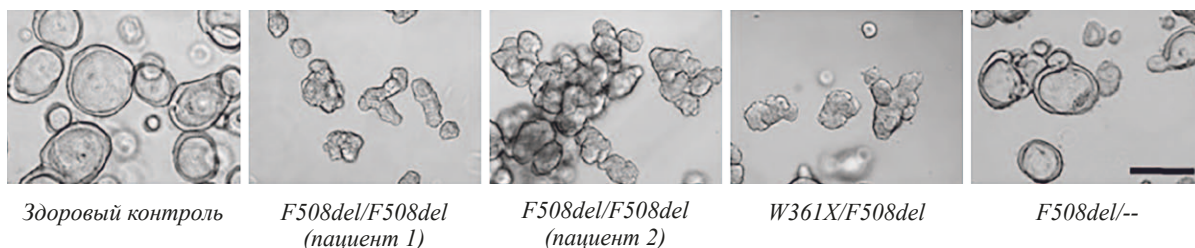


Рис. 1. Морфология культур кишечных органоидов, полученных от четырех пациентов, в генотипе которых выявлен патогенный F508del вариант. 3 сут. культивирования. Масштабная шкала 200 мкм.

Fig. 1. Morphology of cultures of intestinal organoids obtained from four patients in genotype of which pathogenic F508del variant is identified. 3 days of cultivation. Scale bar 200 μm .

морфологические признаки указывают на тяжелую патогенность вариантов F508del и W361X (с.1083G> A) и снижение активности канала CFTR. Наши результаты полностью соотносятся с литературными данными [13–15]. В составе органоидов, полученных от здорового гетерозиготного носителя варианта F508del (4 ребенок), преобладают тонкостенные, что доказывает сохранность высокой остаточной активности канала (рис. 1).

Исследование остаточной функциональной активности хлорного канала и тестирование CFTR-модуляторов для каждого из четырех детей проводили при помощи FIS на органоидах. Известно, что форсколин-индуцированная активация канала CFTR приводит к набуханию органоидов благодаря транспорту воды и ионов хлора во внутреннюю полость органоидов. Для пациентов 1 и 2 с генотипом F508del/F508del было показано полное снижение функции CFTR,

поскольку при действии форсколина в высокой концентрации 5мкМ не наблюдалось набухания органоидов (рис. 2). У пациента 3 в одном из аллелей гена найден патогенный вариант W361X (с.1083G>A). Это редкая мутация относится к I классу, она вызывает образование

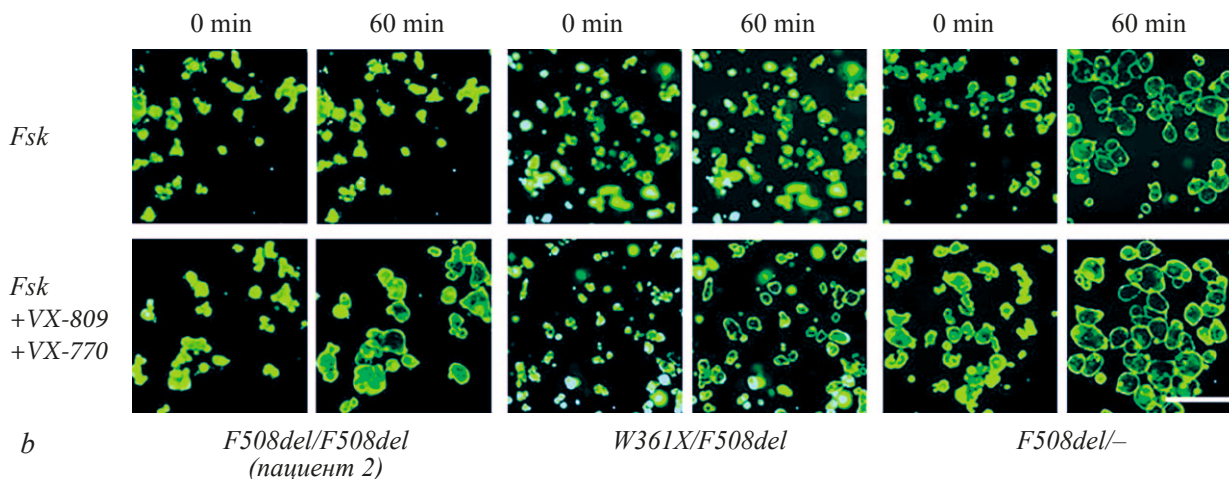
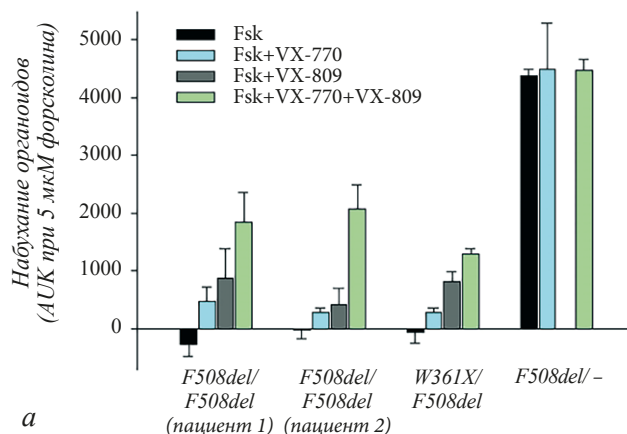


Рис. 2. Анализ остаточной функции CFTR и действия модуляторов при помощи FIS. (а) Количественная оценка FIS; концентрация форсколина – 5 мкМ. (б) Флуоресцентные изображения меченых кальцеином органоидов с обработкой (нижний ряд) или без обработки VX-770 и VX-809 (верхний ряд) в указанные моменты времени при стимуляции 5мкМ форсколином. Масштабная шкала – 500 мкм.

Fig. 2. Analysis of residual CFTR function and effect of modulators with FIS. (A) FIS quantification; Forskolin concentration – 5 μM . (B) Fluorescent images of calcein-green organoids with or without VX-770 and VX-809 treatment at specified points in time when stimulated with 5 μM forskolin. Scale bar 500 μm

преждевременного стоп-кодона в 8 экзоне гена *CFTR* и полное нарушение синтеза белка. У исследуемого пациента данный генетический вариант находится в компаунд гетерозиготном состоянии с F508del, вариантом II класса. Органоиды с данным генотипом не отвечают на стимуляцию форсколином в концентрации 5 мкМ, что говорит об отсутствии проводимости канала *CFTR* (рис. 2).

При действии потенциатора VX-770 происходит незначительное набухание F508del/F508del органоидов, что хорошо видно на графике (рис. 2а). Корректор VX-809 также незначительно увеличивает количество функционального канала *CFTR* на клеточной мембране. Комбинированное применение VX-809 и VX-770 оказывает положительное влияние на восстановление функции канала *CFTR* – к 60 мин наблюдается увеличение размера органоидов практически в 2 раза (рис. 2б).

Полученные результаты согласуются с литературными данными [8, 9, 14] и доказывают, что при генотипе F508del/F508del небольшое количество нефункционального белка *CFTR* присутствует на мембране и модуляторы при комбинированном применении могут быть показаны для терапии таких пациентов. Выявленные эффекты VX-770 и VX-809 для генотипа W361X/F508del были незначительными, поэтому терапия используемыми в эксперименте модуляторами не может быть рекомендована пациенту 3.

В случае с органоидами 4 ребенка, здорового гетерозиготного носителя варианта F508del, был обнаружен значительный эффект набухания при стимуляции форсколином, сопоставимый с контролем, *CFTR*-модуляторы не

усиливали его действия. Эти результаты доказывают наличие полностью функционального канала *CFTR*. При этом 5 мкМ форсколин вызывает максимально возможное набухание органоидов, поэтому дополнительный эффект VX-770 и VX-809 не наблюдается. Таким образом, было еще раз подтверждено, что 4 ребенок является гетерозиготным носителем распространенного варианта F508del. Диагноз муковисцидоза у него был исключен, второй патогенный вариант с использованием метода секвенирования не был обнаружен. Ребенок и его законные представители должны быть информированы о его генотипе, что важно учитывать в будущем при планировании семьи.

Полученные результаты суммированы в табл. 1.

Представленные результаты, наряду с известными публикациями [10, 11], показывают, что с помощью FIS на органоидах человека можно точно оценить функцию *CFTR* и потенциальную возможность эффективности применения таргетной терапии *CFTR*-модуляторами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ».

ЛИТЕРАТУРА

1. www.cftr2.org
2. https://mukoviscidoz.org/doc/registr/10472_block_Registre_2017%20site.pdf

Таблица 1

Объединенные результаты по всем пациентам

Combined results for all patients

Генотип пациента	Класс мутаций	Морфологическое строение кишечных органоидов	Ответ на форсколин	Влияние VX-770	Влияние VX-809	Влияние VX-770 + VX-809	Функция <i>CFTR</i>
F508del/F508del (2 пациента)	II / II	люмен редуцирован, неправильная форма органоидов	–	+	+	+	не рабочий
F508del/W361X	II / I	люмен редуцирован, неправильная форма органоидов	–	–	+	+	не рабочий
Носитель F508del	II / –	гетерогенный состав с преобладанием тонкостенных органоидов с большим люменом	+	–	–	–	рабочий

Примечание: – отсутствие влияния; + и ++ увеличение набухания органоидов на 10–50% и 50–100%, соответственно, по сравнению с действием только 5 мкМ форсколина.

Note: – no effect; + and ++ increase in swelling of organoids by 10–50% and 50–100%, respectively, compared to the action of only 5 μM forskoline.

3. Oliver K.E., Rauscher R., Mijnders M. et al. Slowing ribosome velocity restores folding and function of mutant CFTR. *J Clin. Invest.*, 2019, 129(12), 5236–5253. doi: 10.1172/JCI124282
4. Bobadilla J.L., Macek M.J., Fine J.P. et al. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations—correlation with incidence data and application to screening. *Human mutation*. 2002, 19(6), 575–606. doi: 10.1002 / humu.10041
5. Denning G.M., Anderson M.P., Amara J.F. et al. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*. 1992, 358(6389), 761–764. doi: 10.1038 / 358761a0
6. Lazrak A., Fu L., Bali V. et al. The silent codon change I507-ATC→ ATT contributes to the severity of the ΔF508 CFTR channel dysfunction. *The FASEB Journal*. 2013, 27(11), 4630–4645. doi: 10.1096 / fj.13-227330
7. <https://www.cff.org/Life-With-CF/Treatments-and-Therapies/CFTR-Modulator-Therapies/>
8. Dekkers R., Vijftigschild L.A.W., Vonk A.M. et al. A bioassay using intestinal organoids to measure CFTR modulators in human plasma. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2015, 14(2), 178–181. doi: 10.1016 / j.jcf.2014.10.007
9. Dekkers J. F. Intestinal organoids as model for cystic fibrosis: дис. – Utrecht University, 2015. doi:10.1183 / 13993003.02379-2018
10. Beekman J.M. Individualized medicine using intestinal responses to CFTR potentiators and correctors. *Pediatr Pulmonol.*, 2016, 51(S44):S23-S34. doi: 10.1002/ppul.23553
11. Dekkers J.F., van der Ent C.K., Beekman J.M. Novel opportunities for CFTR-targeting drug development using organoids. *Rare Dis.*, 2013, 1(e27112). doi: 10.1056/NEJMra043184
12. Кондратьева Е.И., Мельяновская Ю.Л., Шерман В.Д., и др.. Функциональные методы диагностики нарушений гена CFTR и его продукта. *Вопросы практической педиатрии*. 2018, 13(4), 50–64. doi: 10.20333/2500136-2019-2-60-69
13. Watson C.L., Mahe M.M., Munera J. et al. An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nat Med.*, 2014, 20(11), 1310–1314. doi: 10.1038/nm.3737
14. Dekkers J.F., Gondra R.A.G., Kruisselbrink E. et al. Optimal correction of distinct CFTR folding mutants in rectal cystic fibrosis organoids. *European Respiratory Journal*. 2016, 48(2), 451–458. doi: 10.1183/13993003.01192-2015
15. Dekkers J.F., Berkers G., Kruisselbrink E. et al. Characterizing responses to CFTR-modulating drugs using rectal organoids derived from subjects with cystic fibrosis. *Science translational medicine*. 2016, 8(344), 344ra84–344ra84. doi: 10.1126/scitranslmed.aad8278.

Evaluation of CFTR Channel Functions and Responses to Modulators in Patients with Cystic Fibrosis who Have a Pathogenic F508del Variant in Their Genomes

N.V. BULATENKO^{1*}, A.S. EFREMOVA¹, T.B. BUKHAROVA¹, N.V. PETROVA¹,
N.Yu. KASHIRSKAYA¹, Yu.L. MELYANOVSKAYA¹, R.A. ZINCHENKO¹, E.I. KONDRATYEVA¹,
and D.V. GOLDSTEIN¹

¹ Reserch Centre for Medical Genetics (RCMG), Moscow, 115478, Russia

*e-mail: bnv695@gmail.com

Received March 20, 2020

Revised April 14, 2020

Accepted July 07, 2020

Abstract—Intestinal organoids derived from rectal biopsies of cystic fibrosis patients are a highly sensitive personalized method for evaluating the functional activity of the CFTR channel and the efficacy of target drugs. We examined four patients whose genotype contains the pathogenic F508del variant (three patients and one healthy heterozygous person). It was shown that F508del/F508del genotype (two patients) could be effectively corrected by CFTR modulators (VX-770 and VX-809). The modulators had no significant effect on the restoration of the chlorine CFTR channel function in a patient with the W361X/F508del genotype. The CFTR functional activity in the heterozygous F508del carrier was as high as in the healthy control.

Key words: cystic fibrosis, intestinal organoids, genetic F508del variant, genotype, forskolin-induced swelling (FIS) assay, CFTR modulators

Funding—This study was supported by the Ministry of Science and Higher Education as part of a State Assignment for RCMG.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-4-69-73