

Oponentský posudek na diplomovou práci

Bc. Petra Kašpárka

## Generation of transgenic mouse model to study biological role of KLK5 in epidermis

Diplomová práce Petra Kašpárka, vypracovaná na Oddělení transgenních modelů nemocí pod vedením Dr. Radislava Sedláčka, je zaměřena na zřejmé téma školící laboratoře – přípravu transgenního myšího modelu.

Kokrétním cílem práce bylo připravit transgenní myší kmen, který by specificky lokalizovanou nadprodukcí myšího proteinu Klk5 do horních vrstev pokožky simuloval závažná lidská onemocnění jako atopický ekzém, lupénku či růžovku.

Práce je psaná anglicky, má 69 stran, obsahuje 25 obrázků a 69 citací. Jazykově je práce na poměrně vysoké úrovni. Neobsahuje příliš mnoho překlepů a má jen minimum stylistických chyb. V závěru diplomové práce je zcela vyčerpávající soupis používaného vybavení, přístrojů, chemikálií a enzymů.

**LITERÁRNÍ ÚVOD** je přiměřeně obsáhlý (11 stran), velice hezky srozumitelný a přehledný. Provádí čtenáře didakticky přes popis kůže, jejích funkcí, patologické stavy kůže, úlohu kallikreinů v fyziologii kůže a vztah k onemocněním kůže až detailnímu popisu proteinu kallikreinu 5 (KLK5). Pro úplné pochopení úlohy KLK5 vztahu k jmenovaným kožním onemocněním mi však chybí podrobnější informace o možné regulaci exprese *KLK5*. **Je něco známo o tom, jaké faktory (zranění, zánět, ...), či signální dráhy (NF- $\kappa$ B, AP-1,...) mají vliv na expresi KLK5, či alespoň jiných kallikreinů?**

**Je známo, zda je u pacientů trpících nějakým z jmenovaných kožních onemocnění zvýšená exprese KLK5?**

Z části **MATERIÁL A METODY** je zřejmé, že Petr Kašpárek zvládl celou řadu molekulárně biologických technik – klonování a práci s plasmidovou DNA, transformaci (včetně přípravy kompetentních baterií) a transfekci, práci s tkáňovými kulturami, SDS PAGE a imunofluorescenci i techniky histologické a *in vivo* studie – manipulace s myším modelem, měření proteolytické aktivity enzymů a modelování zranění a měření regenerace kůže.

K této části mám jen pár drobných komentářů:

V části 2.1.4 je zmiňován kit GeneJet, není však uveden jeho výrobce. V soupisu kitů již ale uveden je. Rovněž v části 2.1.4 (a v jiných) je dopodrobna rozepsáno krok za krokem požití kitu, ale v části 2.1.9 je u techniky purifikace DNA pomocí kitu napsáno pouze, že bylo postupováno podle návodu výrobce. Metody by mohly být popsány souroději, myslím, že všude stačí udávat, že bylo postupováno podle návodu výrobce.

Naproti tomu část 2.4.2 měla být popsána obsáhleji. Z daného textu se dá tušit že se vztahuje k přípravě vzorků pro SDS PAGE z buněčných kultur, přestože by zde mělo být popsáno získání vzorků z tkáně (neboť dle výsledků byla metoda SDS PAGE použita pouze pro získání dat k Fig. 21 – Western blot detekce Klk5 v extraktech kůže transgenních myší).

Tabulka č.3 na straně 29 je ve skutečnosti tabulkou č.5.

V části 2.4.2 není udaná molarita Tris-HCl u RIPA pufru.

V části 2.5.2 chybí poslední krok – montování sklíček po nabarvení.

Dle části 2.6 byli na *in vivo* testy použiti transgenní a wt samci. **Proč byli používáni stále samci? Bylo to pouze příhodnější, nebo se u nich dal čekat „lepší“ fenotyp než u samic?**

Část **VÝSLEDKŮ** je přehledně členěna na dvě hlavní podkapitoly. Oddíl 3.2 popisuje nejprve přípravu vektoru pro reportérovou myš a následně popis expresního profilu transgenního konstruktů jak *in vitro* tak *in vivo*. Podkapitola 3.3 se potom věnuje samotné transgenní myši a funkčním testům jimž byl tento myší model podroben.

K části výsledků bych měl komentáře závažnějšího charakteru:

V 3.2.2, kde je testován reportérový transgenní konstrukt na buňkách, chybí u Fig. 8 kontrola transfekce HEPG2 buněk. Z vyobrazených výsledků není jasné, zda buňky nesvítlí proto, že tam reportérový konstrukt není exprimován, nebo proto, že buňky nebyly transfekovány (přestože další pokusy ukazují, že exprese reportéru tdTomato je lokalizována přinejmenším do epitelálních tkání a vyloučena v játrech, z nichž jsou HEPG2 buňky odvozeny, považují za důležité transfekovatelnost HEPG2 alespoň okomentovat).

V 3.2.3, v poslední větě, autorovi pravděpodobně vypadlo slovo cells (...one- or two- cell stage embryos...)

Fig. 11 zobrazuje výsledky genotypování reportérových transgenních myší. Chybí mi zde však výsledek genotypování myší 4775, 4780 a 4870. A bohužel zde, a ve zbytku práce také, nejsou popsány primery které byly použity jako interní kontrola genotypování a tím pádem není popsán PCR produkt, který se objevuje ve všech vzorcích genotypovaných zvířat, včetně negativní wt kontroly.

Fig. 12 považuji za nedostatečně popsanou. Pravděpodobně jsou zde zobrazeny horní poloviny těl dvou myší, jež byly oholeny od krku dolů. Uvítal bych zde barevnou fotografii, nebo alespoň vysvětlující popis.

**V části 3.3 a následně i v diskusi mi chybí jakýkoliv výsledek, nebo alespoň zmínka o tom, že mKlk5, použitá pro transgenezi (s FLAG tagem na C konci), je funkční. A toto považuji za důležité zdůraznit, zejména proto, že transgenní myší linie Inv-Klk5 sice možná mají vyšší expresi Klk5, ale funkčního enzymu neobsahují více než wt myši a jejich fenotyp odpovídá wt.**

V oddílu 3.3.1, kde je zmiňována příprava konstruktů pro transgenezi, bych považoval za dobré uvést, že konstrukt byl sekvenován (na odhalení případných mutací) – rovněž zejména proto, že transgenní myš má wt fenotyp.

K 3.3.2 mám jen drobný komentář, že k imunofluorescenčnímu barvení transfekovaných buněk není nutné používat netransfekované buňky jako kontrolu. Lepší je ukázat buňky

vyfocené i na bright field, čímž se objeví i ty nenabarvené, netransfekované buňky, které jsou vedle těch transfekovaných.

U 3.3.4, výsledku genotypování, bych měl ten stejný komentář jako k Fig.11. Navíc šipka na obrázku má zřejmě ukazovat někam jinam.

V části 3.3.5.1 je metodou qRT PCR ukázáno, že některé linie transgenních myší exprimují více *Klk5* a některé méně. Protože však pro transgenezi byla použita cDNA *Klk5* nejsou použité primery schopny odlišit cDNA připravenou z transgenní mRNA a kontaminací genomickou DNA. Myslím, že výsledky qRT PCR bez reverzní transkriptázy by měly u obrázku být alespoň komentovány.

**Také by mě u této části výsledků zajímalo, proč nebyla na detekci transgenního *Klk5* použita FLAG protilátka? Na Wester blot funguje velice dobře...**

Část **DISKUSE** je napsána opět velmi srozumitelně a přehledně. Bohužel zde chybí komentář k některým výše jmenovaným otázkám.

Zde bych chtěl pisateli položit ještě další otázky:

**Jaký je názor autora na rozdílnou úroveň exprese jednotlivých transgenních linií a rozdílnou expresi transgenů u potomků jedné transgenní myši (Fig 21)? Je to dáno spíše rozdílem v počtu inzercí, nebo je to závislé na místě integrace? A jak je silný involucrinový promotor ve srovnání s např. promotorem pro nějaký hojně zastoupený keratin?**

**Je známá mutace genu pro Kallikrein 5, či jiný, u pacientů trpících lupénkou, atopickým ekzémem, či růžovkou? (alespoň jeden případ, aby ukázal, že *KLK5* je příčinou nějakého z těchto onemocnění)**

Celkově na mě práce Petra Kašpárka působí poněkud rozporuplným dojmem. Metodicky a jazykově dokazuje autorovu zkušenost a zručnost, bohužel ve výsledcích a jejich interpretaci je její největší slabost.

I přesto je to práce poměrně kvalitní a doporučuji ji přijmout k obhajobě. Po náležitém vysvětlení hlavních nedostatků (což jsou: 1. funkční test enzymatické aktivity mKlk5 s FLAG tagem, 2. detekce exprese transgenního mKlk5 v kůži pomocí anti-FLAG protilátky, 3. detekce exprese transgenního mKlk5 pomocí qRT PCR) a ostatních komentářů navrhuji hodnotit stupněm výborně.

V Praze, 15.9.2010

Mgr. Bohumil Fafílek