

Peptidázy příbuzné kallikreinu (KLK) představují rodinu vzájemně spřízněných serinových proteáz, které jsou kódovány geny umístěnými v jediném chromozomálním lokusu. Jejich exprese byla popsána v mnoha tkáních a řada experimentů *in vitro* naznačuje významnou roli KLK v mnoha fyziologických i patologických procesech. Přesto jsou skutečné úlohy KLK v živém organismu stále ne zcela objasněny, což je způsobeno zejména nedostatkem vhodných zvířecích modelů pro jejich studium. Přestože genově-deficientní myší modely pro některé KLK již byly vytvořeny, jejich význam pro objasnění rolí těchto proteáz v komplexním prostředí živého organismu byl jen omezený. Jednou z hlavních překážek je částečný funkční překryv mezi některými KLK. Inaktivace jednoho genu tudíž často nevede ke změně fenotypu v důsledku funkční kompenzace mezi jednotlivými proteázami. Zdá se tedy, že klasické myší modely deficientní pro jeden gen jsou ne zcela vhodným nástrojem pro studium KLK *in vivo*.

V této práci jsme použili TAL efektor nukleázy (TALENy) pro přípravu několika nových mutantních myších linií, které umožňují analýzu komplexních proteolytických sítí tvořených KLK a studium jejich role ve zdravém organismu i během chorobných procesů. Připravili jsme nový model pro Nethertonův syndrom (NS), autosomálně recesivní kožní chorobu způsobenou mutací v genu *SPINK5*, který kóduje inhibitor KLK - LEKTI. NS je spojený se zvýšenou proteolytickou aktivitou KLK, která vede k chronickému zánětu kůže, postižení vlasů a výraznému narušení kožní bariéry. Náš nový model pro NS je založen na modifikaci myšího genomu tak, aby obsahoval v genu *Spink5* mutaci dříve popsanou u pacienta s NS. Prokázali jsme, že myši nesoucí tuto mutaci věrně mimikují symptomy NS a v důsledku selhání kožní bariéry umírají krátce po narození. Abychom popsali roli KLK v patologii NS, připravili jsme mutantní myší linie deficientní pro KLK5, KLK7 a dvojitě-deficientní pro KLK5 a KLK7, které jsme následně křížili s mutanty pro *Spink5*. Ukázali jsme, že zatímco samotná inaktivace KLK5 ani KLK7 není dostatečná pro potlačení letálního fenotypu myší postrádajících inhibitor LEKTI, současná inaktivace obou proteáz vede k úplnému vymizení kožních defektů, díky čemuž jsou myši schopny dosáhnout dospělosti, kdy nevykazují žádné poruchy kůže ani růstu srsti. Prokázali jsme, že obě proteázy – KLK5 i KLK7 – hrají významnou úlohu při vyvolání zánětu a rozvoji poruch kožní diferenciaci, jež jsou specifické pro NS a také že proteolytická aktivita KLK7 není výhradně závislá na aktivaci KLK5. Detailní analýza myší dvojitě deficientních pro KLK5 a KLK7 pak prokázala, že se u těchto mutantů za fyziologických podmínek rozvine silná hyperkeratóza. Jde o první důkaz *in vivo*, že jsou obě proteázy zapojeny do procesu odlučování kožních buněk z povrchu pokožky.

Ukázali jsme také, že technologie TAL-efektor nukleáz může být využita pro přípravu netradičních myších mutantních modelů, ve kterých pouze některé buňky vykazují ablaci cílového genu (tj. genetických mozaik). Díky mozaikové inaktivaci genu *Spink5* jsme pak připravili mutantní myši, jež vykazovaly nadměrnou proliferaci keratinocytů, chronický zánět a alopecii, tedy symptomy spojené s

NS. Na rozdíl od *Spink5*-deficientních myších linií, *Spink5* - mozaiky neumírají krátce po narození, což umožňuje celou řadu dlouhodobých experimentů, např. testování preparátů určených pro léčbu NS.

Souhrnně vzato, pomocí technologie programovatelných nukleáz jsme připravili několik mutantních myších linií deficientních pro KLK proteázy nebo jejich inhibitor LEKTI. Zevrubná analýza těchto modelů pomohla objasnit některé aspekty molekulární patogeneze Nethertonova syndromu a také role KLK5 a KLK7 v homeostázi kůže. Věříme, že tyto modely i v budoucnu přispějí k vývoji preparátů pro léčbu Nethertonova syndromu a pro další studium rolí KLK v živém organismu.