

Oponentský posudek dizertační práce

Mgr. Petr Kašpárek

Generation and analysis of mutant mouse models to study pathophysiological roles of KLK5 and KLK7 in epidermis

Dizertační práce Mgr. Petra Kašpárka se skládá celkem ze tří publikací a jednoho rukopisu, který je v současné době dokončován. Dvě stěžejní publikované práce se týkají role specifických proteáz zvaných kallikreiny (KLK) při obnově a funkci pokožky (epidermis) a proteinu SPINK5, který inhibuje aktivitu KLK. V literárním úvodu kladl Petr Kašpárek významný zřetel na molekulární podstatu některých kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida, lupénka (psoriasis) nebo růžovka (rosacea). U těchto kožních patologií byly zjištěny vysoké hladiny exprese některých genů z rodiny KLK. Důsledkem velké proteolytické aktivity KLK je nadměrná degradace korneodesmozómů spojující povrchové keratinocyty, které vyústí v patologické odlupování epidermis spojené s častými kožními záněty. Cílem dizertační práce Petra Kašpárka bylo etablování myších modelů pro zmíněná kožní onemocnění s mutovanými geny KLK a SPINK5. K mutagenезi se Petr rozhodl použít nukleázy TALEN a jednovláknové oligonukleotidy nesoucí požadovanou mutaci. Chtěl bych zde vyzdvihnout, že tento moderní přístup vysoce specifické mutagenезe in vivo byl v ČR využit poprvé, pokud je mi známo. To potvrzuje mimořádně vysokou kvalitu předložené dizertační práce. Zavedení a optimalizaci této unikátní metody Petr detailně popisuje v publikaci Kašpárek et al., FEBS Letters 2014, která charakterizuje TALEN cílený pro genový lokus ROSA26. Dále popisuje velmi promyšleně sestavené fluorescenční reportérové plazmidy, monitorující rekombinaci v cílovém místě.

Druhá z publikací (Kašpárek et al. Biological Chemistry, 2016) byla věnována vytvoření myšího modelu pro Nethertonův syndrom, což je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutací v genu SPINK5. Tento gen kóduje inhibitor proteáz KLK a jeho inaktivace u pacientů vyvolává zmíněný syndrom charakteristický silným poškozením pokožky spojeným se záněty, často i zakrněním růstu, astmatem a dalšími defekty. I když myší linie s inaktivovaným genem SPINK5 už byla popsána, Petr Kašpárek vytvořil mutaci v dinukleotidu 402delTG pomocí TALENu, která zavede terminační kodon v důležité regulační oblasti genu. Vzniklá genetická změna přesně kopíruje mutaci popsanou u některých pacientů trpících Nethertonovým syndromem. Myši s oběma pozměněnými

alelami SPINK5 umírají během několika hodin po narození a nesou všechny kožní znaky typické pro lidské pacienty.

Funkční propojení SPINK5 a genů KLK Petr následně ověřil v myších mutantech, kde byly současně inaktivovány geny KLK5, KLK7 a SPINK5. Vytvořil mutaci v KLK7 opět pomocí připraveného TALENu. Zvolená strategie umožnila mutagenezi v přímém sousedství genu KLK5, čehož by šlo těžko docílit standardním křížením. Analýza novorozených mláďat trojitého knock-outu ukázala, že ztráta genů KLK5 a KLK7 významně mírní kožní patologie způsobené ztrátou SPINK5. Tato práce, publikovaná v prestižním časopise PLOS Genetics, 2016, potvrzuje zásadní roli dvou členů rodiny KLK5 a KLK7 při formování a obnově pokožky. Petr Kašpárek pod školitelským vedením dr. Radislava Sedláčka předložil dizertační práci na vynikající úrovni, zahrnující tři prvoautorské publikace. Zároveň je spoluautorem několika dalších publikací, které tématicky s dizertací nesouvisí. Literární přehled je dobře tématicky členěn, experimentální přístupy jsou na světové úrovni. Biologická data zásadně posunují naše poznání funkce kallikreinových proteáz v pokožce a objasňují molekulární podstatu řady kožních onemocnění. Angličtina je bezchybná a celkové vypracování dizertace také. Toto velmi zajímavé vědecké téma mě povzbudilo k pár otázkám, které jsou míněny spíše jako námět do diskuze:

1. Je znám mechanismus regulace genů pro KLK? Jsou umístěny velmi blízko sebe v jednom shluku, a přesto různé paralogy mají různou expresi v pokožce, jak zmíněno v úvodu.
2. Myslíte si, že bude možné vyvinout chemickou molekulu, která bude inhibovat funkci KLK podobně jako SPINK5?
3. Zajímavým jevem je mozaiková mutagenese při aplikaci nižších koncentrací TALENu. Můžete to nějak komentovat?

Závěrem s radostí konstatuji, že dizertační práci Petra Kašpárka doporučuji k přijetí a udělení titulu PhD.

RNDr. Ondřej Machoň, PhD.

Ústav molekulární genetiky AVČR

