

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



Synopsis of PhD thesis
Autoreferát disertační práce

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

Tvorba a analýza mutantních myších modelů pro studium
patofyziologické role KLK5 a KLK7 v pokožce

Petr Kašpárek

Praha, 2017

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Zdena Pálková, CSc.

Školící pracoviště: Oddělení transgenních modelů nemocí, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Autor: Mgr. Petr Kašpárek

Školitel: Radislav Sedláček, PhD.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Contents/ Obsah

Abstract.....	4
Introduction	5
Aims of the study.....	7
List of methods.....	7
Results and Discussion.....	8
Conclusions	13
Abstrakt.....	14
Úvod.....	15
Cíle práce	17
Seznam použitých metod.....	17
Výsledky a Diskuze.....	18
Závěry	23
Použitá literatura/References	24
Curriculum Vitae (česky).....	28
Curriculum Vitae (in English).....	29
List of publications/ Seznam publikací.....	30

Abstract

Kallikrein-related peptidases (KLKs) constitute a family of closely related serine proteases encoded by genes clustered in one chromosomal locus. KLKs are widely expressed in a variety of tissues and numerous *in vitro* experiments suggest their important roles in many physiological and pathological processes. However, the biological roles of KLKs *in vivo* are often obscured mainly due to unavailability of suitable animal models. Although gene deficient mouse models were generated for several KLK genes, they had limited use for understanding the roles of individual proteases in the complex environment *in vivo*. One of the main obstacles which hampers *in vivo* analysis is partial functional overlap between some KLKs. This makes traditional single-gene deficient animal models an inadequate tool to address the biological impact of the gene deficiency as compensatory mechanisms often result in a lack of phenotype.

In this work, we used the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) technology to generate several novel mutant mouse models to study the complex KLK proteolytic pathways and their roles in healthy organism and in disease. We prepared a novel mouse model for Netherton syndrome (NS), an autosomal recessive skin disorder caused by mutation in the gene *SPINK5*, which encodes the KLK-inhibitor LEKTI. NS is associated with hyperactivity of KLKs, which results in the chronic inflammation of skin, hair defects and a severe disruption of skin barrier. By mimicking a patient-derived mutation of *SPINK5* in mouse genome, we generated a mutant mouse that mimics the symptoms of NS patients and shows early post-natal lethality due to skin barrier failure. To address the roles of KLKs in the disease, we prepared a set of mutant mice individually or simultaneously deficient for KLK5 and KLK7 that were crossed with *Spink5* mutants. We showed that although single ablation of KLK5 or KLK7 is not sufficient to rescue the lethal effect of LEKTI-deficiency, simultaneous inactivation of both KLKs completely rescues the epidermal barrier and the postnatal lethality allowing mice to reach adulthood with fully functional skin and normal hair growth. We also showed that both proteases KLK5 and KLK7 play important roles in the inflammation and defective differentiation in NS and KLK7 activity is not solely dependent on activation by KLK5. Furthermore, detailed analysis of KLK5/KLK7 double-deficient mice revealed prominent epidermal hyperkeratosis, which is the first *in vivo* evidence that both proteases are involved in the physiological process of shedding the epidermal cells from the skin surface.

We also demonstrated that TALEN technology can be efficiently used to produce unconventional animal models in which only a portion of cells is characterized by ablation of targeted gene (genetic mosaics). Mosaic inactivation of *Spink5* gene in mice generates a viable model for NS, which is characterized by patches of lesional skin that reproduces NS symptoms such as keratinocyte hyperproliferation, defective differentiation and alopecia. In contrast to traditional *Spink5*-deficient animals, *Spink5*-mosaics survive the neonatal period, which allows long term experiments, such as evaluation of therapeutic compounds.

In summary, we have used the technology of programmable nucleases to generate several novel mouse models deficient for KLK proteases or their inhibitor LEKTI. Detailed analysis of these mice brought novel insights into the molecular pathogenesis of Netherton syndrome and also into the roles of KLK5 and KLK7 in skin homeostasis. We believe that these animal models will become useful tools for development of therapeutic compounds for NS treatment and for further characterization of KLK proteolytic pathways *in vivo*.

Introduction

Kallikrein-related peptidases (KLKs) are a subgroup of serine proteases that are expressed in many tissues and participate in a variety of physiological and pathophysiological processes. The family of KLKs consist of 15 genes, that are located in one chromosomal locus and they are highly conserved in all mammals (1, 2). Majority of KLKs are expressed in the upper skin layer – epidermis (3). Based on numerous *in vitro* experiments, KLK5 and KLK7 have been proposed to play important roles in several processes that are crucial for proper function of epidermis. KLKs 5 and 7, together with KLKs 1, 6 and 14 are able to cleave desmoglein1 (DSG1), desmocollin1 (DSC1) and corneodesmosin (CDSN) – components of corneodesmosomes, the cell-cell junctions between the cells of *stratum corneum* (SC) - the most superficial epidermal compartment (4, 5). It is assumed that proteolytic degradation of corneodesmosomes is one of key steps in desquamation – physiological process in which dead keratinocytes are shed from the skin surface (6). However, there is no evidence that KLKs are involved in desquamation *in vivo*. KLK5 was also shown to play an important role in the modulation of cutaneous inflammation via proteolytic activation of PAR2 receptors (7). Both, KLK5 and KLK7 are linked to the processing of antimicrobial peptides located on the skin surface. Thus, these proteases may play a role in antimicrobial defense of epidermis (8).

Proteolytic activity of KLKs is mainly regulated by two processes – conversion of their inactive precursors into active proteases or by their interactions with inhibitors. Like other proteolytic enzymes, KLKs are expressed as pro-enzymes that require proteolytic cleavage to become active. In turn they can promote activation of other proteases. Consequently, proteolytic enzymes often form complex activation cascades in which one protease initiates the activity of multiple downstream members and KLKs appear to be important players in the proteolytic network of epidermis. Based on the experiments using recombinant proteins, KLK5 was predicted to play a central part in KLK activation cascades, as it is a potent activator of many other pro-KLKs (including pro-KLK7) and it can also initiate the activation of its own precursor (pro-KLK5)(9).

It is assumed that the most important inhibitor of KLKs in epidermis is lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor (LEKTI). LEKTI, encoded by the gene *SPINK5* (serine protease inhibitor of Kazal-type 5), is expressed in epidermis and other stratified epithelia (10). Full length LEKTI consists of 15 inhibitory domains (D1--D15) and upon synthesis undergoes proteolytic processing into multiple bioactive fragments containing one to six domains with distinct inhibitory specificities (11, 12). LEKTI has been reported to inhibit several proteases including plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, elastase, caspase-14 (13-15), however epidermal KLKs 5, 7 and 14 are believed to be its main *in vivo* targets (16-18).

Ablation of LEKTI due to mutations in the *SPINK5* gene is the underlying factor of a severe skin disease – Netherton syndrome (NS). Newborns suffering from NS exhibit scaly and peeling skin, with chronic inflammation and a severe disruption of epidermal barrier, which in some cases is fatal (19-21). Pathological manifestations of NS are linked to unregulated activities of epidermal proteases. Indeed, detailed analysis revealed that SC extracts isolated from NS patients show enhanced trypsin- and chymotrypsin-like activities, as well as increased processing of corneodesmosomal proteins (22), which suggests epidermal KLKs as candidate proteases responsible for skin defects in NS. Experiments with *Spink5*-deficient mice revealed that multiple proteases are upregulated in the absence of LEKTI, including KLK5, KLK7, KLK14 and elastase 2 (23, 24), however the exact roles of these enzymes in NS pathology remain elusive.

Gene-deficient mutant mice models proved to be valuable for understanding the gene functions *in vivo*. Interestingly, mice deficient for Klk genes often show only minor or no phenotype (25, 26). This is in striking contrast to the key roles of KLKs in proteolytic activation cascades, desquamation and cutaneous-inflammation that were proposed based on experiments *in vitro* and upon characterization of LEKTI-deficient mice. Possibly, the lack of phenotype in KLK- deficient mice can be explained by a functional redundancy of these enzymes. It is known, that many substrates are cleaved by multiple different KLKs. The main corneodesmosomal protein DSG1 can be digested *in vitro* by at least four different KLKs – 1, 5, 6 and 14 (4, 5), while DSC1 and CDSN are degraded by KLKs 5 and 7 (22). Similarly, PAR-2 can be processed by KLKs 5, 6 and 14 (7, 27). It can be assumed that the absence of one protease can be compensated by a different enzyme with a similar substrate specificity.

We speculate that this functional overlap between individual proteases can be elucidated by generation of animals simultaneously deficient for multiple Klk genes. However, close genomic proximity of Klk genes hampers efficient generation of double-deficient mice by cross-breeding of two independent single-gene deficient mouse lines. We believe that recent development of programmable nucleases, such as ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 (28, 29) enables generation of these models that would elucidate the roles of KLKs *in vivo*.

Aims of the study

The main aim of this study was to prepare and characterize novel mutant mouse models that would provide new insights into biological roles of kallikrein-related peptidases in epidermis. Especially we aimed to focus on KLK5 and KLK7 that have been predicted to play important roles in skin homeostasis and pathology.

We believe, that traditional single-gene-deficient mutant models are not the most optimal tools for analysis of KLKs' biological functions. Activity of KLKs *in vivo* is tightly balanced by interactions between individual proteases and further modulated by their inhibitors. Consequently, ablation of a single member in protease-inhibitor network can lead to dysregulation of many other enzymes. Thus, the biological impact of single-gene deficiency can be obscured by non-specific secondary effects. In addition, experiments *in vitro* show that some KLKs share the same substrates, which suggests partial functional overlap between individual proteases. Thus, we aimed to prepare mouse models simultaneously deficient for several KLKs or with combined deficiency for a KLK and its inhibitor. Such models would allow complex analysis of the whole proteolytic cascades and also reveal functional redundancy between individual proteases.

The aims can be further specified, as follows:

- Establishment and optimization of a targeting system that would allow fast and efficient generation of gene-deficient mutant mouse models
- Generation of mutant mice with single or multiple deficiency for proteases KLK5, KLK7 and/or their inhibitor LEKTI (*Spink5* gene)
- Characterization of the mutant phenotypes

List of methods

Cloning of TALENs

in vitro transcription and mRNA polyadenylation

Cloning and preparation of dsDNA constructs for microinjections

Isolation of genomic DNA and PCR-based genotyping

T7 endonuclease assay

Analysis of trans-epidermal water losses

Skin barrier penetration assay

Histology and immunostaining

Gel zymography

SDS-PAGE and western blots

Results and Discussion

TALEN-technology allows rapid and efficient generation of mutant mouse models

In order to establish and optimize the technical approach that would enable the generation of mice deficient for multiple *Klk* genes and/or the inhibitor *LEKTI*, we decided to prepare the TALENs targeting the *Rosa26* locus and validate their efficiency for gene-targeting in mice. Targeting of the *Rosa26* locus allowed us a direct comparison between two groups of programmable nucleases - TALENs and ZFNs, as *Rosa26*-targeting ZFNs were commercially available (Sigma, St. Louis, MO, USA). TALENs^{*Rosa26*} were designed and prepared in-house using web-based tool TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 and Golden Gate Cloning system (30). To test the activity and specificity of TALENs^{*Rosa26*}, we developed a plasmid reporter system, which allows the evaluation of nuclease activity in cultured cells by monitoring the nuclease-triggered expression of TurboRFP gene. This *in vitro* assay showed that TALENs^{*Rosa26*} effectively cleave in the *Rosa26* target sequence, while none of the putative off-target sequences was cut. These results indicated high specificity and efficiency of TALENs^{*Rosa26*}.

Furthermore, we showed that microinjection of TALENs^{*Rosa26*} RNA precursors into mouse one-cell stage embryos generates indel mutations within the target sequence. Analysis of the gene targeting in developing embryos revealed that TALENs^{*Rosa26*} were superior to ZFN^{*Rosa26*} as they showed higher targeting efficiency and lower cytotoxicity. This is in agreement with others who reported higher efficiency of TALENs in a direct comparison with ZFNs recognizing the same target sequence (29).

Most importantly, we showed that TALENs^{*Rosa26*} can be successfully used for production of mutant mice. The mouse strains *Rosa26*-TurboRFP and *Rosa26*-Blueflirt were obtained at a frequency of 2/17 and 1/17, respectively, thus, the overall efficiency of HDR was 8.8 %. This further demonstrates that TALENs are more favourable tool than ZFNs, as ZFN-assisted targeting of *Rosa26* showed the efficiency from 1.7-4.5% (31, 32). Detail analysis of the *Rosa26* target sequence in founder mice revealed presence of three and more allelic variants. Indeed, occurrence of genetic mosaicism was previously described in mutant mice generated by TALENs (33) as well as by other types of programmable nucleases (29). We also demonstrated that mutant mice produced by TALENs^{*Rosa26*} did not carry any indel mutations at putative off-target sites and the transgene was successfully transmitted to F1 generation.

Interestingly, our data suggested that the linear variant of targeting construct, which lacks the vector backbone sequences, was integrated into the genomic DNA with higher efficiency than circular plasmid DNA targeting vector, while the previous studies showed no major differences in the integration of circular or linear targeting vectors (31, 34). We suggest that higher frequency of HDR seen by a shorter linear template may be due to the molar excess of the DNA fragment compared to the complete construct when the same mass of construct is injected. Indeed using short single-stranded oligonucleotide as a targeting constructs appears to be a very efficient approach for PN-mediated HDR in mouse zygotes (28).

In summary, by targeting of mouse *Rosa26* locus, we showed that TALENs prepared by conventional laboratory techniques can be efficiently used for the production of mutant mice carrying indel mutations as well as for targeted integration of a transgene.

Synergistic effects of KLK5 and KLK7 are crucial for the desquamation during maturation of epidermis

Close genomic proximity of *Klk5* and *Klk7* genes hampers efficient generation of KLK5/KLK7 double-deficient mice by cross-breeding of two independent single-gene deficient mouse lines. Thus we applied TALEN mutagenesis for *Klk7* targeting on the genetic background of *Klk5* mutant mice. This approach allowed fast and effective generation of *Klk5*^{-/-}, *Klk7*^{-/-} and *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-} mutant mouse lines. Although newborn pups at postnatal day 0 (P0) did not show any obvious phenotype, *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-} pups developed prominent hyperkeratosis at postnatal days 5-8. We speculate that thickening of *stratum corneum* in *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-} pups is caused by defects in the desquamatory process. It was proposed that the shedding of corneocytes from the skin surface is triggered by proteolytic degradation of corneodesmosomes, the cell-cell junctions between corneocytes in SC (6). KLK5 and KLK7 were reported to be expressed in superficial epidermal layer – *stratum corneum*. (3). Furthermore, both proteases were shown *in vitro* to process DSC1 and CDSN, proteins that form corneodesmosomes (4). Thus it can be assumed that the absence of these enzymes in *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-} epidermis leads to the inhibition of corneodesmosomal degradation and accumulation of corneocytes in upper epidermal layers. Interestingly, KLK5 and KLK7 single-deficient pups did not show any prominent thickening of SC, which suggests that the process of desquamation is not significantly affected in these mice. We speculate that KLK5 can substitute KLK7 function in corneodesmosomal degradation and vice versa. Detailed analysis of corneodesmosomal proteins or their cleaved forms in the KLK5/7 single and double-deficient P8 epidermis would provide interesting insights in the mechanism of desquamatory defects in these mice and in the exact roles of individual proteases in the desquamation.

No obvious phenotype of *Klk5*^{-/-} P8 mice appears to be a result of KLK7 activity, which compensates for the absence of KLK5. These results clearly demonstrate that KLK7 is not entirely dependent on proteolytic activation by KLK5, which was previously proposed based on the experiments *in vitro* (35). The mechanism of pro-KLK7 activation in the absence of KLK5 remains unclear. KLK7 can be activated by matriptase (36) and a recent study also suggests a role of mesotrypsin in pro-KLK7 activation (37).

Interestingly, the adult mice do not show any phenotype pointing to the lack of desquamation. These observations suggest that the desquamatory machinery is differentially regulated in P8 and in adult age. Multiple proteases were shown to process corneodesmosomal proteins, such as KLK1, KLK6 and KLK14 that can cleave DSG 1 (5). Thus the desquamation in adult epidermis is possibly maintained by other players. We speculate that detailed analysis of epidermal proteolytic activities in the epidermis our KLK5/7 -deficient mouse mutants in various ages would provide important insights about regulation of desquamation *in vivo*.

Mutant mice carrying the A135X mutation in the *Spink5* gene manifest the symptoms of Netherton syndrome

To study the molecular pathogenesis of NS in our laboratory, we used TALENs to prepare a novel mouse model with a mutation in *Spink5* gene. High degree of homology between human and mouse *Spink5* genes allowed us generation of p.A135X variant of *Spink5* gene in mice, which closely resembles the p.A134X mutation known from human NS patients (38). We believe that mimicking a human mutation in mice may provide a better alternative for studying human disease in comparison to tradition gene-deficient mice. Introduction of a patient-derived mutation into the *Spink5* gene leads only to a minor modification of genomic nucleotide sequence. This allowed us to avoid the disruption

of potential regulatory sequences, which might lead to the onset of an unspecific phenotype. Additionally, in contrast to gene-deficient mice produced by manipulation of ESCs, *Spink5*^{A135X/A135X} mice lack the targeting cassette containing undesired sequences such as Neomycin resistance gene. It was shown that the presence of a neomycin cassette can result in unspecific effects or lethality (39). Most importantly, mouse model carrying a point mutation in *Spink5* sequence provides novel insights in the molecular pathology of NS. It was proposed that the phenotypical features of NS patients may be dependent on the position of the causative mutation within the *Spink5* coding sequence and the mutations in later exons may result in a less severe phenotype due to hypothetical presence of remaining LEKTI-derived inhibitory domains (40). However, this hypothesis was not experimentally verified. Detail analysis of *Spink5*^{A135X/A135X} newborn pups showed the same defects as previously reported *Spink5*-targeted knock-out mice including aggravated cutaneous inflammation, keratinocyte hyperproliferation and early postnatal lethality at P0 (24, 41, 42). Thus, a point mutation in exon 5 results in the same phenotype as targeted ablation of first four coding exons (24). Furthermore, we showed significant downregulation of *Spink5* mRNA in *Spink5*^{A135X/A135X} mice, likely due to nonsense-mediated mRNA decay. This suggests that the phenotype of *Spink5* mutant mice is independent of the position of *Spink5*-mutation.

In conclusion, we have generated a novel mouse model for NS that closely recapitulates the phenotypical features of NS patients as well as of previously described *Spink5* KO animals. We believe that *Spink5*^{A135X/A135X} mice may be useful tool to study the mechanisms of NS pathology.

Mosaic inactivation of *Spink5* generates a viable mouse model for Netherton syndrome

Although several mutant mouse models for NS were previously described, the main obstacle that hampers analysis of *Spink5*-deficient mutant mice is their early lethality at P0 (24, 41, 42). This does not allow any analysis of adult mice, which might develop different phenotype from newborns. Although this can be partially resolved by grafting the skin obtained from *Spink5*-deficient pups or embryos onto immunocompromised recipient animals (43), such approaches can be associated with undesirable secondary effects resulting from the transplantation and comprehensive analysis might be limited due to the genetic background of the recipient animals.

In this work, we showed that microinjections of *Spink5*-targeting TALENs into the cytoplasm of mouse zygotes can result in mutant mice that survive over P0 and develop patches of alopecic, dysplastic skin, which markedly resembles to that of NS-patients and the LEKTI-deficient skin grafts in mice. We showed that the underlying factor of this skin pathology are indel mutations in the *Spink5* gene, likely due to activity of TALENs in two-cell stage and later embryos. This is in agreement with our previous report of mouse genetic mosaics that were generated upon microinjections of *Rosa26*-targeting TALENs as well as with others, who reported occurrence of genetic mosaicism in founder mice generated by programmable nucleases (29, 33). However, by TALEN-mediated targeting of *Spink5*, we showed that this otherwise undesired phenomenon can be used to study adult phenotypes of genes that are associated with early postnatal lethality. Furthermore, we showed that the incidence of mosaicism can be controlled by the concentrations of nucleases at the one-cell stage embryos. Possibly, the generation of mosaics may be further improved by injection of the nucleases or their precursors into the embryos in later stages of development (i.e. late one-cell stage or two-cell stage).

Detailed analysis of *Spink5* mosaics revealed aggravated cutaneous inflammation, keratinocyte hyperproliferation and disruption of epidermal water-barrier in the lesional areas. Interestingly, *Spink5*-deficient skin developed severe intrafollicular hyperkeratosis, a phenotype that was previously described in mice deficient in corneodesmosomal proteins CDSN and DSC1 (44, 45).

This points to possible defects of these cell-cell adhesion proteins in *Spink5*-deficient epidermis, likely due to unregulated activities of epidermal proteases KLK5, KLK7 and KLK14 – the LEKTI targets that were linked to the degradation of CDSN, DSC1 and DSG1 (4, 5). Indeed, using casein gel zymography, we showed upregulation proteolytic activity in the lesional skin of *Spink5* mosaics.

Interestingly, while the diseased skin of *Spink5* mosaics showed a severe cutaneous phenotype, the surrounding tissue did not reveal any pathological alternations. This provides a unique opportunity to analyse the physiological impacts of LEKTI-deficiency and use the wild type tissue derived from the same individual as an experimental control. We believe that this may especially useful for testing of therapeutic compounds for NS treatment.

In summary, using TALEN mutagenesis, we generated mutant mice that are characterized by *Spink5* ablation in a portion of body cells. In contrast to previously published mouse models of NS, the *Spink5*-mosaics can survive the early postnatal period and they can be used to study to LEKTI- deficient epidermis in adult animals.

Simultaneous inactivation of KLK5 and KLK7 rescues lethal phenotype of *Spink5*^{A135X/A135X} mice

Hyperactivity of epidermal proteases in LEKTI-deficient skin is considered a major source of pathology in Netherton syndrome. To address the pathophysiological roles of KLK5 and KLK7 in NS, we combined KLK5, KLK7 and KLK5/7 –deficient mice with *Spink5*^{A135X/A135X} mutant line.

It has been proposed that the barrier defects observed in LEKTI-deficient skin are caused by premature proteolytic degradation of corneodesmosomal proteins and *in vitro* assays showed that three putative LEKTI targets are able to promote corneodesmosome degradation - KLK5, KLK7, and KLK14 (4). The *in vitro* study of the KLK proteolytic activation cascade proposed that KLK5 acts upstream from KLK7 and KLK14 and therefore, KLK5 hyperactivity should contribute to barrier defects either directly or indirectly via activation of the remaining KLKs. Indeed, significant improvement of skin-barrier defects by inactivation of KLK5 in *Sp5*^{A135X/A135X} mice was observed, however the rescue was incomplete as toluidine blue staining in *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} mice revealed patches of disrupted-barrier distributed all over the body surface. This observation implicates the role of another protease whose activity contributes to barrier defects in the absence of LEKTI and does not depend on KLK5. This was identified as KLK7, since *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} newborn mice did not show any major barrier defects of epidermis. Interestingly, single inactivation of KLK7 on *Sp5*^{A135X/A135X} background did not significantly improve the barrier defects. Therefore, we assume that barrier properties of LEKTI-deficient neonatal epidermis are mainly compromised by direct activity of KLK5 and only to a lesser extent by KLK5-mediated activation of KLK7. The significant contribution of KLK5 to NS pathology is in line with a recent study of Furio et al. showing amelioration of skin barrier-phenotype in *Spink5*-deficient newborns upon KLK5 inactivation (46). Nevertheless, the remaining activity of KLK7 still contributes to the defective barrier and further intensifies with age as *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} show severe epidermal defects manifested by loss of infundibular epidermis at P5. *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} mice exhibit no skin-barrier defects at P5 and most importantly, in contrast to *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} mice, the triple mutants survive to adulthood. The skin defects in *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} P5 pups markedly resemble those observed in mice deficient for corneodesmosomal proteins CDSN and DSC1 (44, 45), which indicates that unregulated activity of KLK7 results in degradation of corneodesmosomes.

Although the lethal phenotype is fully rescued in *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} mutants and the mice do not show any signs of skin barrier-defects leading to dehydration, we observed minor barrier disruptions in the nostril area of newborn pups, which suggests the activity of another protease physiologically inhibited by LEKTI. As the toluidine blue -stained area overlaps with the expression of

KLK14 in late embryonic development, we propose that KLK14 could be responsible for the remaining pathology of LEKTI-deficient mice even in the absence of KLK5 and KLK7. Moreover, we and others also observed expression of KLK14 in hair follicles (47), which makes KLK14 a candidate protease responsible for the development of the bamboo hair defect in $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ animals up to the age of 3 weeks. As reported, the defects of cell adhesion proteins in hair follicles result in “lanceolate hair” – a hair shaft phenotype in mice that strongly resembles the bamboo hairs of $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ mutants and NS patients (48, 49). This further supports a possible role of KLK14 in the formation of bamboo-hair, as KLK14 is linked to the degradation of desmosomal proteins in LEKTI-deficient epidermis (12). Nevertheless, any targets of LEKTI inhibition present in hair follicles, such as caspase-14 (50) or other, currently unidentified proteases, should be considered as a potential cause of bamboo hairs.

Association of NS with abnormal epidermal differentiation accompanied by acanthosis, parakeratosis, and hyperproliferation of keratinocytes was previously reported in $Sp5$ -deficient mouse models (24, 41, 42) and our $Sp5^{A135X/A135X}$ confirms the previous findings. We found clear overexpression of keratin6 in $Sp5^{A135X/A135X}$ E18.5 dpc epidermis, suggesting that events leading to hyperproliferation of keratinocytes are triggered prior to the exposure to the external environment and are a result of unregulated proteolytic activity in the epidermis. In light of the fact that single inactivation of either KLK5 or KLK7 completely rescues the differentiation defects in LEKTI-deficient embryos as well as in newborn mice, we believe that the signalling events resulting in keratinocyte hyperproliferation in neonates depend on the presence of both, KLK5 and KLK7 together. Moreover, we observed that aggravated cutaneous inflammation, which is found in E18.5 $Sp5^{A135X/A135X}$ embryos, fully depends on simultaneous activity of both, KLK5 and KLK7. KLK5 was previously shown to initiate inflammation in LEKTI-deficient epidermis by activation of PAR2, which results in the induction of pro-Th2 and pro-inflammatory cytokines (43, 46, 51). In this study we show that KLK7 is also required for the induction of inflammation in LEKTI-deficient mice as P5 $Klk5^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ pups developed severe acanthosis together with significantly increased expression of $TNF\alpha$, TSLP, IL-33, IL-1 β and ICAM1 while $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ showed no major defects in the epidermis and increased levels of pro-inflammatory cytokines. Altogether, this suggests that inflammation and differentiation changes in older LEKTI-deficient pups (P5) are initiated by KLK7 activity which is independent of KLK5. Indeed, KLK7 was previously shown to induce inflammation and keratinocyte proliferation in the epidermis (52, 53) and a recent study identified KLK7 as a proliferative factor in a mouse model of colon cancer and in human cells *in vitro* (54). The mechanism by which KLK7 induces inflammation and differentiation changes remains to be elucidated. In contrast to KLK5, KLK7 cannot directly activate PAR2 as shown *in vitro* (7) and thus, the inflammation is likely to be triggered by a different mechanism. One possible pathway is the KLK7-mediated conversion of pro-IL1 β to active IL1 β (55), which could affect the inflammatory phenotype of NS- epidermis.

In summary, we show that the individual inactivation of KLK5 or KLK7 only partially rescues the defective skin barrier but not the lethal phenotype of $Sp5^{A135X/A135X}$. Only the concurrent ablation of both KLK5 and KLK7 can fully rescue the lethal phenotype of $Sp5^{A135X/A135X}$ mice, therefore both proteases should be investigated as clinical targets. We show that KLK7 plays an important role in the inflammation and defective differentiation in NS and its activity is not dependent on activation by KLK5. We also show that the pathological effects of unregulated KLK activities are remarkably age dependent. Altogether, this study expounds the complexity of the proteolytic network and its regulation, which are especially important to understand Netherton syndrome and its treatment.

Conclusions

In this work, we have developed several novel mutant mouse models to study the pathophysiological roles of KLK5 and KLK7 in epidermis. Our results can be summed up as follows:

1. TALENs prepared by conventional laboratory techniques can be easily used for mutant mice production. Using TALEN mutagenesis, we have generated mice deficient for KLK5, KLK7 and simultaneously deficient for both proteases. Furthermore, we have prepared *Spink5* –mutant mice to study the roles of KLKs 5 and 7 in Netherton syndrome.
2. TALEN-mediated mosaic inactivation of *Spink5* gene in mice generates a viable mouse model of Netherton syndrome, which allows analysis of this disease in adult animals.
3. KLK5 and KLK7 are required for the desquamation during epidermal maturation. Our data suggest that both proteases functionally overlap in the process of keratinocyte shedding from epidermal surface.
4. Both, KLK5 and KLK7 can induce cutaneous inflammation and abnormal differentiation of LEKTI-deficient epidermis.
5. Simultaneous inactivation of KLK5 and KLK7 fully rescues lethality of a Netherton syndrome mouse model.

Abstrakt

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 v genu *Spink5* obsahoval mutaci dříve popsanou u pacienta s NS. 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 dvojité-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 dvojité 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.

Úvod

Peptidázy příbuzné kallikreinu (KLK) patří do skupiny serinových proteáz a jsou exprimovány v mnoha tkáních, kde se účastní celé řady fyziologických i patologických procesů. Rodina KLK je tvořena 15 geny, které jsou umístěny v jediném chromozomálním lokusu a jsou vysoce konzervovány mezi všemi savci (1, 2). Většina KLK je exprimována v horní vrstvě kůže – pokožce (epidermis) (3). Na základě velkého množství experimentů *in vitro* se předpokládá, že KLK5 a KLK7 hrají důležité role v mnoha procesech, které jsou klíčové pro správné fungování epidermis. KLK 5 a 7 (spolu s KLK 1, 6 a 14) mohou štěpit desmoglein1 (DSG1), desmocollin1 (DSC1) a korneodesmosin (CDSN) – hlavní složky korneodezmozomů, tj. spojují mezi buňkami v nejsvrchnější vrstvě epidermis – *stratu corneae* (SC) (4, 5). Předpokládá se, že právě proteolytická degradace korneodezmozomů je klíčovým krokem v rámci deskvamace – fyziologického procesu, během něhož jsou odlučovány mrtvé kožní buňky z povrchu pokožky (6). Dosud ovšem chybí experimentální důkaz *in vivo*, že se KLK na deskvamaci skutečně podílejí. Bylo popsáno, že KLK5 hraje významnou roli při modulaci kožního zánětu prostřednictvím proteolytické aktivace receptoru PAR2 (7). KLK5 i 7 jsou spojovány se štěpením antimikrobiálních peptidů, jež se vyskytují na povrchu kůže. Zdá se tedy, že by mohly hrát roli v obraně organismu před patogeny (8).

Proteolytická aktivita KLK je regulována především dvěma procesy – konverzí jejich neaktivních prekurzorů na aktivní proteázy a dále jejich interakcemi s inhibitory. Stejně jako jiné proteázy, i KLK jsou produkovány ve formě proenzymů, které musejí být proteolyticky rozštěpeny, aby došlo k jejich aktivaci. Samy se pak mohou podílet na aktivaci dalších proteáz. Proteolytické enzymy tak mohou tvořit komplikované aktivační kaskády, ve kterých jedna proteáza může regulovat aktivitu mnoha jiných „downstream“ enzymů. Zdá se, že KLK jsou důležitými účastníky těchto proteolytických sítí v epidermis. Na základě *in vitro* experimentů s rekombinantními proteiny se předpokládá, že KLK5 hraje centrální úlohu v aktivační kaskádě KLK. Může totiž aktivovat mnoho jiných pro-KLK (včetně KLK7) i svůj vlastní prekurzor (pro-KLK5)(9).

Za hlavní inhibitor KLK v epidermis je považován LEKTI (lymphoepithelial Kazal-type related inhibitor). LEKTI, je kódován genem *SPINK5* (serine protease inhibitor of Kazal- type 5) a je produkován v epidermis i jiných vrstevnatých epitelech (10). Kompletní molekula LEKTI je tvořena 15 inhibičními doménami (D1-D15) a je po své syntéze postupně naštěpena na několik bioaktivních fragmentů, jež mají odlišné inhibiční specifity (11, 12). LEKTI může inhibovat řadu proteáz, jako je například plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, elastáza, caspáza-14 (13-15), ale za hlavní proteázy inhibované pomocí LEKTI *in vivo* jsou pokládány KLK5, 7 a 14 (16-18).

Inaktivace inhibitoru LEKTI v důsledku mutace genu *SPINK5* je příčinou vážné kožní choroby – Nethertonův syndrom (NS). Novorozenci s NS mají šupinatou, odlupující se pokožku s chronickým zánětem a narušenou epidermální bariérou, což může v nejvážnějších případech končit smrtí pacienta (19-21). Symptomy NS jsou spojovány s neregulovanou aktivitou epidermálních proteáz. Bylo prokázáno, že extrakty z SC od pacientů s NS vykazují zvýšenou aktivitu tryptických a chymotryptických proteáz a nadměrnou degradaci korneodezmozomálních proteinů (22). To naznačuje, že proteázami zodpovědnými za kožní defekty u pacientů s NS by mohly být KLK. Experimenty na myších deficientních pro *Spink5* prokázaly, že absence LEKTI vede ke zvýšení aktivity několika proteáz, např. KLK5, KLK7, KLK14 nebo elastázy 2 (23, 24). Přesná úloha těchto enzymů v patologii NS ovšem zůstává neobjasněna.

Genově deficientní mutantní myší modely jsou cenné nástroje pro pochopení funkce genu v organismu. Je zajímavé, že myši postrádající geny pro KLK vykazující často jen mírný, nebo žádný fenotyp (25, 26). To je v rozporu s předpokládanými důležitými úlohami KLK v proteolytických kaskádách, deskvamaci nebo při indukci kožního zánětu, jež byly předpovězeny na základě experimentů *in vitro* nebo díky analýze mutantních myší postrádajících LEKTI.

Absenci fenotypu myší deficientních pro KLK lze vysvětlit funkčním přesahem těchto enzymů. Bylo popsáno, že mnoho jejich předpokládaných substrátů je štěpeno více než jedním KLK. *In vitro* experimenty ukazují, že hlavní komponenta korneodezmozomů – DSG1 může být štěpen alespoň čtyřmi různými KLK – 1, 5, 6 a 14 (4, 5), přičemž DSC1 a CDSN jsou degradovány KLK5 a 7 (22). PAR2 pak může být štěpen KLK5, 6 a 14 (7, 27). Dá se tedy předpokládat, že absence jedné proteázy může být funkčně kompenzována jiným enzymem s podobnou substrátovou specifitou.

Domníváme se, že tento funkční překryv mezi jednotlivými KLK lze odhalit s využitím mutantních zvířat, která by postrádala více než jeden gen kódující KLK. Těsná blízkost genů pro KLK ovšem neumožňuje snadnou přípravu takovýchto modelů prostým zkřížením dvou myších linií deficientních v jednom genu. Věříme, že nedávný rozvoj technologií programovatelných nukleáz (ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9) (28, 29) vytvoření takovýchto modelů umožňuje. Jejich analýza pak může přispět k detailnějšímu pochopení funkcí KLK v živém organismu.

Cíle práce

Hlavním cílem této práce byla příprava a charakterizace nových mutantních myších modelů, které by pomohly objasnit role peptidáz-příbuzných kallikreinu v pokožce. Zejména nám pak šlo o detailní objasnění funkcí KLK5 a KLK7, u kterých se předpokládá velký význam při udržování kožní homeostázy i v patologických stavech.

Domníváme se, že standardní mutantní myší modely postrádající jeden gen nejsou optimálním nástrojem pro analýzu biologických funkcí KLK. Aktivita KLK *in vivo* je držena v rovnováze jak díky vzájemným interakcím jednotlivých proteáz, tak díky jejich inhibitorům. Pokud je některý člen této vyvážené soustavy proteáz a jejich inhibitorů odstraněn, dojde k dysregulaci mnoha dalších enzymů. Přímé funkční důsledky inaktivace jednoho genu pak mohou být překryty těmito nespecifickými efekty. S pomocí *in vitro* experimentů bylo též prokázáno, že mnoho KLK sdílí společné substráty, tudíž se dá očekávat částečný funkční překryv mezi jednotlivými proteázami. Z těchto důvodů jsme se rozhodli pro přípravu takových myších modelů, které by kombinovaly delecí několika KLK nebo jejich inhibitorů. Věříme, že takové modely umožní komplexní studium rozsáhlých proteolytických soustav a také mohou odhalit funkční překryv mezi jednotlivými proteázami.

Cíle práce mohou být specifikovány následovně:

- Etablování a optimalizace technologií, které by umožnily rychlou a účinnou přípravu genově deficientních myších modelů
- Příprava mutantních myší deficientních pro proteázy KLK5, KLK7 a/nebo jejich inhibitor LEKTI (gen *Spink5*)
- Charakterizace fenotypů připravených myších modelů

Seznam použitých metod

Příprava TALEN-vektorů

in vitro transkripce a polyadenylace mRNA

Klonování dsDNA konstruktů a jejich příprava pro mikroinjekce

Izolace genomické DNA a genotypování pomocí PCR

Analýza DNA pomocí T7 endonukleázy

Analýza trans-epidermální dehydratace

Analýza propustnosti kožní bariéry

Barvení tkáňových preparátů pomocí hematoxylinu a eosinu

Imunohistochemie

Gelová zymografie

SDS-PAGE a metoda Western Blot

Výsledky a Diskuze

Technologie TAL-efektor nukleáz umožňuje rychlou a účinnou přípravu mutantních myších modelů

Abychom etablovali a optimalizovali technologii, která by umožnila přípravu mutantních myší deficientních pro několik *Klk* genů a/nebo jejich inhibitor LEKTI, rozhodli jsme se připravit TAL-efektor nukleázy cílící na myší lokus *Rosa26* a otestovat jejich účinnost při cílené inaktivaci myších genů. Volba lokusu *Rosa26* nám umožnila přímé srovnání dvou skupin programovatelných nukleáz – TAL-efektor nukleáz a zinc-finger nukleáz (ZFN), jelikož ZFN cílící na myší lokus *Rosa26* byly komerčně dostupné (Sigma, St. Louis, MO, USA). TAL-efektor nukleázy cílící na *Rosa26* lokus (TALENy^{Rosa26}) byly navrženy a připraveny v naší laboratoři pomocí online nástroje TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0 a setu pro molekulární klonování Golden Gate Cloning (30).

Abychom otestovali aktivitu a specifitu TALENů^{Rosa26}, sestrojili jsme plazmidový reportérový systém, který umožňuje evaluaci nukleáz v buněčné kultuře na základě produkce fluorescenčního proteinu TurboRFP, která je iniciována specifickou nukleázovou aktivitou. Následná analýza *in vitro* prokázala, že TALENy^{Rosa26} účinně štěpí cílovou sekvenci *Rosa26*, zatímco nespecifické (tzv. off-target) sekvence štěpeny nebyly. Tyto výsledky naznačují vysokou účinnost a specifitu TALENů^{Rosa26}.

Následně jsme ukázali, že mikroinjekcí RNA prekursorů kódujících TALENy^{Rosa26} do jednobuněčných myších embryí jsme schopni vytvářet indel (inserční nebo deleční) mutace v cílové sekvenci. Ukázali jsme, že TALENy^{Rosa26} jsou účinnější než ZFN^{Rosa26}, neboť dosahují vyšší efektivity štěpení při nižší cytotoxicitě. Tyto výsledky jsou v souladu i s jinými laboratořemi, které prokázaly vyšší účinnost TALENů ve srovnání se ZFN cílenými na stejnou sekvenci (29).

Hlavním přínosem této práce pak byl experimentální důkaz, že TALENy^{Rosa26} mohou být úspěšně využity pro přípravu mutantních myší. Pomocí TALENů^{Rosa26} jsme připravili dvě mutantní myší linie *Rosa26-TurboRFP* a *Rosa26-Blueflirt*, které jsme získali s účinností 2/17 (pozitivní zvířata/narozená), resp. 1/17. To představuje souhrnnou účinnost homologní rekombinace v zygotách 8.8 %. Tyto výsledky jen potvrzují, že TALENy představují účinnější nástroj než ZFN, jelikož účinnost homologní rekombinace v zygotách s využitím ZFN dosahovala 1.7 – 4.5 % (31, 32). Zevrubná analýza cílové sekvence *Rosa26* u mutovaných myší z F0 generace prokázala, že některé myši nesou tři nebo více alelických variant. Podobný genetický mosaicismus byl skutečně již dříve pozorován u myší připravených pomocí TALENů (33). Dále jsme prokázali, že mutantní myši připravené pomocí TALENů^{Rosa26} nenesly žádné mutace v tzv. off-target genomových oblastech a že došlo k úspěšnému přenesení transgenů do F1 generace.

Zajímavostí je, že linearizovaný konstrukt pro integraci, který neobsahoval vektorové strukturní sekvence, byl integrován do genomické DNA s vyšší účinností, než cirkulární DNA plazmid. Přestože práce jiných autorů neukázaly zásadní rozdíl mezi cirkulárními a lineárními konstrukty (31, 34), domníváme se, že vyšší účinnost HDR v případě lineárního konstruktů mohla být způsobena jeho molárním nadbytkem ve srovnání s větším cirkulárním plazmidem, který byl injikován ve stejném množství. Tento předpoklad je v souladu se skutečností, že injekcí velmi krátkých jednovláknových DNA oligonukleotidů lze dosáhnout velmi vysoké eficeience HDR v myších zygotách (28).

Souhrnně vzato, při mutagenезi myšího lokusu *Rosa26* jsme prokázali, že TALENy připravené pomocí standardních laboratorních technik mohou být efektivně využity pro přípravu mutantních myší nesoucí indel mutace i místně-specificky integrovaný transgenový konstrukt.

Synergie mezi proteázami KLK5 a KLK7 je zásadní pro deskvamaci během maturace epidermis

Lokalizace genů *Klk5* a *Klk7* v těsné blízkosti v rámci jednoho lokusu neumožňuje snadnou přípravu myši dvojnásobně deficientních pro *Klk5/Klk7* prostým zkřížením dvou genově-deficientních linií. Rozhodli jsme se tudíž pro mutagenезi *Klk7* pomocí TALENů na genetickém pozadí myši s již inaktivovaným *Klk5*. Tento přístup nám umožnil rychlou a efektivní přípravu *Klk5^{-/-}*, *Klk7^{-/-}* and *Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}* mutantních myších linií.

Přestože novorozené myši (P0) nevykazovaly žádný zjevný fenotyp, u mláďat z linie *Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}* se rozvinula výrazná hyperkeratóza ve věku 5-8 dnů. Domníváme se, že ztluštění *strata cornea* u *Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}* je způsobeno poruchami během procesu deskvamace. Předpokládá se, že odlučování korneocytů z povrchu kůže je podmíněno proteolytickou degradací korneodezmozomů, tj. buněčných spojů mezi korneocyty ve *stratu corneae* (6).

Bylo prokázáno, že KLK5 a KLK7 jsou přítomny v SC (3). Ví se také, že obě proteázy dokážou štěpit *in vitro* DSC1 a DSG1 – tj. Proteiny, jež jsou součástí korneodezmozomů (4). Dá se tedy předpokládat, že absence obou proteáz v kůži *Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}* myši vede k inhibici degradace korneodezmozomů a tudíž k akumulaci korneocytů ve vrchních vrstvách pokožky. Je zajímavé, že myši postrádající samotný KLK5 nebo KLK7 nevykázaly výrazné ztluštění SC, což poukazuje na fungující deskvamaci v těchto zvířatech. Domníváme se tudíž, že KLK5 může částečně funkčně nahradit KLK7 a opačně. Zevrubná analýza přítomnosti korneodezmozomálních proteinů nebo jejich naštěpených forem v KLK5/KLK7 – deficientní epidermis by mohla přinést cenné poznatky ohledně příčin kožních defektů v těchto zvířatech a také ohledně funkcí jednotlivých proteáz při procesu deskvamace.

Zdá se, že absence zjevného fenotypu v *Klk5^{-/-}* myších v čase P8 je důsledkem aktivity KLK7, který je schopen zastoupit roli KLK5. To jasně ukazuje, že aktivita KLK7 není výhradně závislá na aktivaci pomocí KLK5, jak bylo navrženo na základě experimentů *in vitro* (35). Přesný mechanismus aktivace pro-KLK7 v nepřítomnosti KLK5 zůstává nejasný. Bylo ukázáno, že KLK7 může být aktivován matriptázou (36) a nedávno publikovaná práce ukazuje možnost aktivace pro-KLK7 mesotrypsinem (37).

Dospělé myši neprojevují žádné defekty, které by ukazovaly na poruchy deskvamace. To naznačuje, že deskvamační proces je rozdílně regulován ve dni P8 a v dospělosti. Bylo prokázáno, že i jiné proteázy jsou schopny štěpit korneodezmozomální proteiny, například KLK1, KLK6 a KLK14, které mohou štěpit DSG1 (5). Je tedy možné, že deskvamaci v dospělém věku zajišťují jiné enzymy než KLK5 a KLK7. Domníváme se, že detailnější analýza aktivity epidermálních proteáz v námi připravených KLK5/KLK7-deficientních myších v různých vývojových stádiích by mohla přinést cenné poznatky ohledně regulace deskvamace *in vivo*.

Mutantní myši nesoucí mutaci A135X v genu *Spink5* vykazují fenotyp připomínající Nethertonův syndrom

Abychom mohli studovat patogenezi NS v naší laboratoři, vytvořili jsme s pomocí TALENů novou myšičí model nesoucí mutaci v genu *Spink5*. Vysoká homologie mezi lidským a myšičím genem *Spink5* nám umožnila vytvoření myši s mutací p.A135X v genu *Spink5*, jež je blízce podobná mutaci p.A134X popsané u lidských pacientů s NS (38). Věříme, že myši nesoucí mutaci podobající se lidské variantě představují vhodnější model pro studium lidské nemoci oproti tradičním genově-deficientním modelům. Vytvoření mutace odvozené z lidského pacienta vede jen k nepatrné změně v kódující sekvenci myšičího genu *Spink5*. Díky tomu nemůže dojít k narušení hypotetických regulačních sekvencí, které by mohlo vyvolat nespecifický fenotyp. Myši z linie *Spink5^{A135X/A135X}* navíc postrádají selekční

kazetu, jež je obvykle přítomna v genově-deficientních myších připravených tradičním způsobem pomocí modifikace ESC. Bylo prokázáno, že přítomnost selekční kazety obsahující gen pro neomycinovou rezistenci může vyvolat nespecifické efekty, případně letální fenotyp (39). Co je nejdůležitější, myší model s bodovou mutací ve *Spink5* může přinést nové poznatky ohledně patogeneze NS. Byl vysloven předpoklad, že fenotypické projevy u pacientů s NS se mohou odvíjet od pozice mutace v kódující sekvenci *Spink5*, přičemž mutace ve vzdálenějších (3' proximálních) oblastech genu *Spink5* mohou způsobovat méně závažný fenotyp v důsledku hypotetické exprese inhibičních fragmentů odvozených z LEKTI (40). Tato hypotéza nicméně nebyla nikdy experimentálně prokázána. Analýzou myší *Spink5*^{A135X/A135X} jsme ukázali, že vykazují stejné defekty jako dříve popsané „knock-out“ modely postrádající *Spink5* – kožní zánět, zvýšenou proliferaci keratinocytů a časnou postnatální letalitu v čase P0 (24, 41, 42). Zdá se tedy, že bodová mutace v exonu5 vede ke stejnému fenotypu, jako delece prvních čtyř exonů genu *Spink5* (24). Navíc jsme u myší *Spink5*^{A135X/A135X} prokázali významné snížení exprese mRNA pro *Spink5*, pravděpodobně v důsledku tzv. „nonsense-mediated mRNA decay“. Lze se tedy domnívat, že fenotyp myší s mutací v genu *Spink5* je nezávislý na přesné poloze této mutace v rámci kódující sekvence.

Mozaikovou inaktivací genu *Spink5* lze získat životaschopný myší model pro Nethertonův syndrom

Přestože bylo popsáno několik mutantních myších modelů pro NS, jednou z hlavních překážek, která znesnadňuje analýzu myší s mutací v genu *Spink5* je jejich časná letalita krátce po narození (P0) (24, 41, 42). Z tohoto důvodu je znemožněna analýza dospělých jedinců, jejichž fenotyp se může lišit od novorozeneckých mláďat. Částečným řešením může být transplantace kožních štěpů ze *Spink5*-deficientních myší na mláďata nebo embrya z imunodeficientních myších linií (43). Transplantace ovšem může být doprovázena nejrůznějšími nechtěnými vedlejšími efekty a rozdílné genetické pozadí donorových a recipientních zvířat může znemožňovat komplexní analýzu.

V této práci jsme ukázali, že mikroinjekcí TALENů specifických pro *Spink5* do myších zygot lze získat mutantní zvířata, která přežívají dobu delší než P0, a u kterých se postupně vyvine alopecie a kožní léze, nápadně připomínající kůži pacientů s NS nebo kožní štěpy odvozené z myší postrádajících LEKTI. Ukázali jsme, že rozvoj těchto lézí je podmíněn indel mutacemi v genu *Spink5*, které pravděpodobně vznikají ve dvou a vícebuněčných embryích. Tento jev je v souladu s námi již dříve pozorovaným genetickým mozaicismem u myší, které byly připraveny pomocí mikroinjekce TALENů specifických pro *Rosa26*. Přestože je genetický mozaicismus v myších připravených programovatelnými nukleázami obecně považován za nežádoucí jev, v naší práci jsme ukázali, že jej lze efektivně využít pro studium fenotypů, které jsou jinak spojeny s časnou novorozeneckou letalitou. Prokázali jsme také, že incidence mozaicismu může být ovlivněna koncentrací nukleáz injikovaných do jedno-buněčných embryí. Domníváme se, že cílené vytváření genetických mozaik by šlo dále podpořit injikováním nukleáz do pozdějších vývojových stádií (např. do pozdních jednobuněčných, nebo dvoubuněčných embryí).

Zevrubná analýza *Spink5* -mozaikových myší prokázala, že jejich kožní léze jsou charakterizovány kožním zánětem, zvýšenou proliferací keratinocytů a narušenou vodní bariérou. Zajímavostí je, že se v oblastech kožních lézí vyvine silná intrafolikulární hyperkeratóza, jež nápadně připomíná fenotyp myší deficientních pro korneodezmozomální proteiny DSC1 a CDSN (44, 45). Tato skutečnost naznačuje možné defekty v buněčných spojích v epidermis s poškozeným genem *Spink5*, pravděpodobně v důsledku neregulované aktivity epidermálních proteáz KLK5, KLK7 a KLK14. Tyto proteázy, za fyziologických podmínek inhibované LEKTI, jsou na základě analýzy *in vitro* spojovány

s degradací proteinů CDSN, DSC1 a DSG1 (4, 5). Kaseinová gelová zymografie skutečně prokázala zvýšení aktivity kožních proteáz u *Spink5*-mozaikových myší.

Zatímco postižená kůže *Spink5*-mozaikových myší se vyznačuje výrazným kožním fenotypem, okolní tkáň nejeví žádné patologické změny. To umožňuje nejen studium kůže postrádající LEKTI, ale současně využití zdravé „wild-type“ tkáně ze stejného zvířete jakožto experimentální kontroly. Věříme, že tato skutečnost může najít uplatnění zejména při testování látek určených pro terapii NS.

Souhrnně vzato, pomocí TALENů jsme vytvořili mutantní myši, které postrádají funkční gen *Spink5* jen v některých buňkách. Na rozdíl od dříve popsáných myších modelů pro NS, tyto *Spink5*-mozaikové myši přežívají období po porodu a mohou být využity pro studium LEKTI-deficience na dospělé kůži.

Současná inaktivace KLK5 a KLK7 vede k potlačení letálního fenotypu u myší *Spink5*^{A135X/A135X}

Zvýšená aktivita epidermálních proteáz v kůži postrádající inhibitor LEKTI je považována za hlavní příčinu patologických změn u Nethertonova syndromu. Abychom objasnili role KLK5 a KLK7 v patologii NS, zkřížili jsme myši postrádající KLK5, KLK7 a KLK5/KLK7 s myším modelem pro NS *Spink5*^{A135X/A135X}.

Předpokládá se, že defekty epidermální bariéry v kůži postrádající LEKTI jsou způsobeny proteolytickou degradací korneodezmozomálních proteinů, přičemž *in vitro* analýzy ukazují, že tři proteázy inhibované pomocí LEKTI mohou způsobovat degradaci korneodezmozomů – KLK5, KLK7 a KLK14 (4). KLK5 byl považován za hlavní příčinu patologických změn, jelikož předchozí experimenty naznačovaly, že je nezbytný pro aktivaci zbývajících dvou proteáz – KLK7 a KLK14 (35).

Prokázali jsme, že inaktivace KLK5 v myších *Sp5*^{A135X/A135X} skutečně vede k výraznému vylepšení jejich kožní bariéry, nicméně detailní analýza bariéry pomocí eseje založené na barvení toluidinovou modří ukázala, že myši *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} stále vykazují defekty bariéry menšího rozsahu difúzně distribuované po celém povrchu jejich těla. To naznačuje aktivitu ještě další proteázy, jež přispívá ke kožním defektům při absenci LEKTI a jejíž aktivita nezávisí na KLK5. Prokázali jsme, že touto proteázou je KLK7, jelikož novorozené myši z linie *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} již neměly žádné defekty, jež by ukazovaly na narušení epidermální bariéry. Domníváme se tedy, že defekty kožní bariéry v myších postrádajících LEKTI jsou vyvolané zejména přímou aktivitou KLK5 a jen do menší míry jím zprostředkovanou aktivací pro-KLK7. Námi popsaná významná role KLK5 v patologii NS je v souladu s nedávnou studií od Furio et al., ve které ukázali výrazné vylepšení kožního fenotypu myší s inaktivovaným genem *Spink5* po následné inaktivaci KLK5 (46). My ovšem dále ukazujeme, že KLK7 nejenže stále významně přispívá k narušení kožní bariéry, ale jeho patologická aktivita se zintenzivňuje s věkem pokusných zvířat a myši *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} ve věku P5 vykazují výrazné kožní defekty spojené se ztrátou keratinocytů v horním segmentu vlasových folikulů. *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} oproti tomu neukazují ve věku P5 žádné poruchy kožní bariéry a na rozdíl od myší z linie *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} se dožívají dospělého věku. Kožní defekty u myší z linie *Klk5*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} ve věku P5 nápadně připomínají poruchy epidermis u myší, které postrádají korneodezmozomální proteiny CDSN nebo DSC1 (44, 45). To naznačuje, že aktivita KLK7 přispívá k degradaci těchto korneodezmozomálních proteinů.

Přestože je u myší *Klk5*^{-/-}*Klk7*^{-/-}*Sp5*^{A135X/A135X} plně potlačený letální fenotyp a tato zvířata neukazují žádné poruchy kožní bariéry, které by vedly k dehydrataci, pozorovali jsme u nich drobné narušení kožní bariéry v oblasti nozder, což naznačuje přítomnost a aktivitu ještě třetí proteázy, jež je za fyziologických podmínek inhibovaná LEKTI. Vzhledem k tomu, že se oblast s narušenou bariérou v okolí nozder překrývá s oblastí, v níž je exprimován KLK14, věříme, že právě tato proteáza může být

zodpovědná za zbývající defekty vyvolané absencí LEKTI v $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$. Bylo též ukázáno, že KLK14 je produkován ve vlasových folikulech (47), což naznačuje, že by KLK14 mohl být zodpovědný za defekty chlupů (bambusové vlasy), jež se na $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ myších objevují do cca 3 týdne věku. Bylo prokázáno, že defekty v proteinech tvořících buněčné spoje jsou u myši spojeny s výskytem tzv. „lanceolate hair“ – poruch chlupů které výrazně připomínají „bambusové vlasy“ v $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ mutantech a v pacientech s NS (48, 49). To dále podporuje možný vliv KLK14 na vývoj „bambusových vlasů“, vzhledem k tomu, že KLK14 může štěpit dezmozomální proteiny v kůži postrádající LEKTI (12).

NS je u člověka spojený s poruchami diferenciací kůže, jako je akantóza, parakeratóza a zvýšená proliferace keratinocytů, přičemž myši postrádající inhibitor LEKTI ukazují stejné defekty (24, 41, 42). I mutantní linie $Sp5^{A135X/A135X}$ připravená v naší laboratoři vykazuje zvýšenou expresi keratinu 6 v epidermis E18.5 embryí, což naznačuje nadměrnou proliferaci keratinocytů, ke které dochází ještě před vystavením kůže vnějším faktorů, tedy zřejmě v důsledku neregulované aktivity epidermálních proteáz. Vzhledem k tomu, že inaktivace KLK5 a/nebo KLK7 kompletně odstraní poruchy epidermální diferenciací v embryích i v novorozených myších postrádajících LEKTI, usuzujeme, že tyto defekty závisí na současné přítomnosti obou proteáz. Stejně tak jsme pozorovali, že i kožní zánět u E18.5 embryí linie $Sp5^{A135X/A135X}$ je vyvolán současnou aktivitou obou proteáz – KLK5 i KLK7. Již dříve bylo ukázáno, že KLK5 je ovlivňuje zánět epidermis postrádající LEKTI díky aktivaci receptoru PAR2, která iniciuje produkci pro-zánětlivých a pro-TH2 cytokinů (43, 46, 51). V naší práci jsme ukázali, že i KLK7 může vyvolat zánětlivou reakci, vzhledem k tomu že u myši z linie $Klk5^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ se ve věku P5 rozvine silná akantóza doprovázená zvýšenou expresí TNF α , TSLP, IL-33, IL-1 β a ICAM1 zatímco myši $Klk5^{-/-}Klk7^{-/-}Sp5^{A135X/A135X}$ nevykazují žádné poruchy diferenciací ani kožní zánět. Z těchto výsledků vyplývá, že za defekty v epidermální diferenciaci a za zánětlivou reakci u mláďat ve věku P5 je zodpovědná aktivita KLK7, jež je nezávislá na aktivaci pomocí KLK5. Tyto výsledky jsou v souladu s jinými studiemi, které ukazují, že KLK7 může vyvolat zánět a proliferaci keratinocytů (52, 53).

Způsob, jak aktivita KLK7 vyvolává kožní zánět a poruchy diferenciací, není zcela jasný. Na rozdíl od KLK5, KLK7 není schopen *in vitro* aktivovat receptor PAR2 (7) je tedy pravděpodobné, že tyto patologické změny jsou vyvolány jiným mechanismem. Jednou z možností je dříve popsaná konverze pro-IL1 β na aktivní IL1 β , vyvolaná aktivitou KLK7 (55).

Souhrnně vzato, ukázali jsme, že inaktivace KLK5 nebo KLK7 v myších $Sp5^{A135X/A135X}$ dokáže do jisté míry zmírnit patologické změny spojené s NS, nikoliv však jejich letální fenotyp. Až současná inaktivace obou proteáz najednou vede úplnému potlačení letality myši $Sp5^{A135X/A135X}$. Obě proteázy by tedy měly být brány v potaz při léčbě NS u lidí. Ukázali jsme, že KLK7 hraje důležitou roli při rozvoji kožního zánětu a diferenciací poruch v kůži postrádající LEKTI, a že aktivita KLK7 plně nezávisí na aktivaci KLK5. Zajímavostí je, že příspěvek obou proteáz k patologii NS je úzce závislý na věku zkoumaných zvířat. Věříme, že naše výsledky pomohly k pochopení mechanismů regulace proteáz v epidermis a patologie NS.

Závěry

V této práci jsme vytvořili několik nových mutantních myších modelů, které nám umožnily studium patofyziologických rolí proteáz KLK5 a KLK7 v pokožce. Naše výsledky lze shrnout následovně:

1. TALENy připravené s využitím běžně dostupných laboratorních technik lze snadno využít pro přípravu mutantních myších linií. Pomocí TALEN-mutagenese jsme vytvořili mutantní myši postrádající jednotlivé proteázy KLK5 nebo KLK7 a také mutanty postrádající obě proteázy současně. Dále jsme vytvořili myši nesoucí mutaci v genu *Spink5* pro studium rolí KLK5 a 7 v Nethertonově syndromu.
2. Mozaikovou inaktivací genu *Spink5* pomocí TALENů lze vytvořit životaschopný myší model pro Nethertonův syndrom. Tato zvířata mohou být využita pro studium této nemoci na dospělých jedincích.
3. Proteázy KLK5 a KLK7 hrají významnou roli při deskvamaci během maturace pokožky. Naše výsledky ukazují částečný funkční překryv mezi oběma proteázami při procesu odlučování keratinocytů z povrchu pokožky.
4. Obě proteázy, KLK5 i KLK7, mohou vyvolat zánět a diferenciacní defekty v pokožce postrádající inhibitor LEKTI.
5. Současnou inaktivací proteáz KLK5 a KLK7 lze potlačit letální fenotyp myšího modelu pro Nethertonův syndrom.

Použitá literatura/References

1. Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA. Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J Biol Chem*. 2000;275(48):37397-406.
2. Lundwall A, Clauss A, Olsson AY. Evolution of kallikrein-related peptidases in mammals and identification of a genetic locus encoding potential regulatory inhibitors. *Biol Chem*. 2006;387(3):243-9.
3. Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, et al. Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br J Dermatol*. 2005;153(2):274-81.
4. Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;122(5):1235-44.
5. Borgono CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, et al. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J Biol Chem*. 2007;282(6):3640-52.
6. Suzuki Y, Nomura J, Koyama J, Horii I. The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res*. 1994;286(5):249-53.
7. Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, et al. Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J Invest Dermatol*. 2008;128(1):18-25.
8. Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, et al. Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J*. 2006;20(12):2068-80.
9. Lundwall A, Brattsand M. Kallikrein-related peptidases. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(13):2019-38.
10. Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, et al. Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nature genetics*. 2000;25(2):141-2.
11. Bitoun E, Micheloni A, Lamant L, Bonnart C, Tartaglia-Polcini A, Cobbold C, et al. LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. *Hum Mol Genet*. 2003;12(19):2417-30.
12. Fortugno P, Bresciani A, Paolini C, Pazzagli C, El Hachem M, D'Alessio M, et al. Proteolytic activation cascade of the Netherton syndrome-defective protein, LEKTI, in the epidermis: implications for skin homeostasis. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(11):2223-32.
13. Bennett K, Callard R, Heywood W, Harper J, Jayakumar A, Clayman GL, et al. New role for LEKTI in skin barrier formation: label-free quantitative proteomic identification of caspase 14 as a novel target for the protease inhibitor LEKTI. *J Proteome Res*. 2010;9(8):4289-94.
14. Mitsudo K, Jayakumar A, Henderson Y, Frederick MJ, Kang Y, Wang M, et al. Inhibition of serine proteinases plasmin, trypsin, subtilisin A, cathepsin G, and elastase by LEKTI: a kinetic analysis. *Biochemistry*. 2003;42(13):3874-81.
15. Jayakumar A, Kang Y, Mitsudo K, Henderson Y, Frederick MJ, Wang M, et al. Expression of LEKTI domains 6-9' in the baculovirus expression system: recombinant LEKTI domains 6-9' inhibit trypsin and subtilisin A. *Protein Expr Purif*. 2004;35(1):93-101.
16. Egelrud T, Brattsand M, Kreutzmann P, Walden M, Vitzithum K, Marx UC, et al. hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. *The British journal of dermatology*. 2005;153(6):1200-3.

17. Schechter NM, Choi EJ, Wang ZM, Hanakawa Y, Stanley JR, Kang Y, et al. Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). *Biol Chem.* 2005;386(11):1173-84.
18. Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, et al. LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell.* 2007;18(9):3607-19.
19. Bitoun E, Chavanas S, Irvine AD, Lonie L, Bodemer C, Paradisi M, et al. Netherton syndrome: disease expression and spectrum of SPINK5 mutations in 21 families. *The Journal of investigative dermatology.* 2002;118(2):352-61.
20. Smith DL, Smith JG, Wong SW, deShazo RD. Netherton's syndrome: a syndrome of elevated IgE and characteristic skin and hair findings. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95(1 Pt 1):116-23.
21. Sun JD, Linden KG. Netherton syndrome: a case report and review of the literature. *Int J Dermatol.* 2006;45(6):693-7.
22. Descargues P, Deraison C, Prost C, Fraitag S, Mazereeuw-Hautier J, D'Alessio M, et al. Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *The Journal of investigative dermatology.* 2006;126(7):1622-32.
23. Bonnart C, Deraison C, Lacroix M, Uchida Y, Besson C, Robin A, et al. Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing. *The Journal of clinical investigation.* 2010;120(3):871-82.
24. Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, et al. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nature genetics.* 2005;37(1):56-65.
25. Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, et al. Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J Biol Chem.* 2007;282(8):5834-41.
26. Kishibe M, Baida G, Bhalla P, Lavker RM, Schlosser B, Iinuma S, et al. Important role of kallikrein 6 for the development of keratinocyte proliferative resistance to topical glucocorticoids. *Oncotarget.* 2016;7(43):69479-88.
27. Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Tea I, Blaber M, Blaber SI, et al. Proteinase-activated receptors, targets for kallikrein signaling. *J Biol Chem.* 2006;281(43):32095-112.
28. Wefers B, Meyer M, Ortiz O, Hrabe de Angelis M, Hansen J, Wurst W, et al. Direct production of mouse disease models by embryo microinjection of TALENs and oligodeoxynucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(10):3782-7.
29. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology.* 2013;31(7):397-405.
30. Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research.* 2011;39(12):e82.
31. Meyer M, de Angelis MH, Wurst W, Kuhn R. Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107(34):15022-6.
32. Hermann M, Maeder ML, Rector K, Ruiz J, Becher B, Burki K, et al. Evaluation of OPEN zinc finger nucleases for direct gene targeting of the ROSA26 locus in mouse embryos. *PloS one.* 2012;7(9):e41796.
33. Li C, Qi R, Singleterry R, Hyle J, Balch A, Li X, et al. Simultaneous gene editing by injection of mRNAs encoding transcription activator-like effector nucleases into mouse zygotes. *Mol Cell Biol.* 2014;34(9):1649-58.
34. Cui X, Ji D, Fisher DA, Wu Y, Briner DM, Weinstein EJ. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology.* 2011;29(1):64-7.

35. Brattsand M, Stefansson K, Lundh C, Haasum Y, Egelrud T. A proteolytic cascade of kallikreins in the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 2005;124(1):198-203.
36. Sales KU, Masedunskas A, Bey AL, Rasmussen AL, Weigert R, List K, et al. Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. *Nat Genet.* 2010;42(8):676-83.
37. Miyai M, Matsumoto Y, Yamanishi H, Yamamoto-Tanaka M, Tsuboi R, Hibino T. Keratinocyte-specific mesotrypsin contributes to the desquamation process via kallikrein activation and LEKTI degradation. *The Journal of investigative dermatology.* 2014;134(6):1665-74.
38. Raghunath M, Tontsidou L, Oji V, Aufenvenne K, Schurmeyer-Horst F, Jayakumar A, et al. SPINK5 and Netherton syndrome: novel mutations, demonstration of missing LEKTI, and differential expression of transglutaminases. *The Journal of investigative dermatology.* 2004;123(3):474-83.
39. Scacheri PC, Crabtree JS, Novotny EA, Garrett-Beal L, Chen A, Edgemon KA, et al. Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice. *Genesis.* 2001;30(4):259-63.
40. Komatsu N, Saijoh K, Jayakumar A, Clayman GL, Tohyama M, Suga Y, et al. Correlation between SPINK5 gene mutations and clinical manifestations in Netherton syndrome patients. *J Invest Dermatol.* 2008;128(5):1148-59.
41. Hewett DR, Simons AL, Mangan NE, Jolin HE, Green SM, Fallon PG, et al. Lethal, neonatal ichthyosis with increased proteolytic processing of filaggrin in a mouse model of Netherton syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14(2):335-46.
42. Yang T, Liang D, Koch PJ, Hohl D, Kheradmand F, Overbeek PA. Epidermal detachment, desmosomal dissociation, and destabilization of corneodesmosin in Spink5^{-/-} mice. *Genes Dev.* 2004;18(19):2354-8.
43. Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnart C, Robin A, Besson C, et al. Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med.* 2009;206(5):1135-47.
44. Chidgey M, Brakebusch C, Gustafsson E, Cruchley A, Hail C, Kirk S, et al. Mice lacking desmocollin 1 show epidermal fragility accompanied by barrier defects and abnormal differentiation. *J Cell Biol.* 2001;155(5):821-32.
45. Leclerc EA, Huchencq A, Mattiuzzo NR, Metzger D, Chambon P, Ghyselinck NB, et al. Corneodesmosin gene ablation induces lethal skin-barrier disruption and hair-follicle degeneration related to desmosome dysfunction. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 15):2699-709.
46. Furio L, Pampalakis G, Michael IP, Nagy A, Sotiropoulou G, Hovnanian A. KLK5 Inactivation Reverses Cutaneous Hallmarks of Netherton Syndrome. *PLoS genetics.* 2015;11(9):e1005389.
47. Bhogal RK, Mouser PE, Higgins CA, Turner GA. Protease activity, localization and inhibition in the human hair follicle. *Int J Cosmet Sci.* 2014;36(1):46-53.
48. Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell.* 2003;113(2):249-60.
49. Montagutelli X, Hogan ME, Aubin G, Lalouette A, Guenet JL, King LE, Jr., et al. Lanceolate hair (lah): a recessive mouse mutation with alopecia and abnormal hair. *The Journal of investigative dermatology.* 1996;107(1):20-5.
50. Alibardi L, Tschachler E, Eckhart L. Distribution of caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammals. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005;286(2):962-73.
51. Briot A, Lacroix M, Robin A, Steinhoff M, Deraison C, Hovnanian A. Par2 inactivation inhibits early production of TSLP, but not cutaneous inflammation, in Netherton syndrome adult mouse model. *The Journal of investigative dermatology.* 2010;130(12):2736-42.
52. Hansson L, Backman A, Ny A, Edlund M, Ekholm E, Ekstrand Hammarstrom B, et al. Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *The Journal of investigative dermatology.* 2002;118(3):444-9.

53. Ny A, Egelrud T. Epidermal hyperproliferation and decreased skin barrier function in mice overexpressing stratum corneum chymotryptic enzyme. *Acta Derm Venereol.* 2004;84(1):18-22.
54. Walker F, Nicole P, Jallane A, Soosaipillai A, Mosbach V, Oikonomopoulou K, et al. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. *Biol Chem.* 2014;395(9):1075-86.
55. Nylander-Lundqvist E, Egelrud T. Formation of active IL-1 beta from pro-IL-1 beta catalyzed by stratum corneum chymotryptic enzyme in vitro. *Acta Derm Venereol.* 1997;77(3):203-6.

Curriculum Vitae (česky)

Jméno: Petr Kašpárek
Datum narození: 13.8.1985
E-mail: kasperek.cz@gmail.com

Vzdělání

10/2010 – současnost: PhD student, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.
10/2008 – 02/2010 Magisterské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta
Buněčná a vývojová biologie
10/2006 – 07/2008 Bakalářské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta
Molekulární biologie a biochemie organismů

Pracovní zkušenosti

10/2010 – dodnes Výzkumný pracovník (postgraduální student), Ústav molekulární genetiky AV
ČR, v.v.i., Oddělení Transgenních modelů nemocí
10/2008 – 07/2010 Výzkumný pracovník (pregraduální student), Ústav molekulární genetiky AV
ČR, v.v.i., Oddělení Transgenních modelů nemocí

Výuka

- Školitel nebo konzultant bakalářských nebo magisterských studentů (2011-2016)
 - Radmila Hanečková (bakalářské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, 2013-2014)
 - Radmila Hanečková (magisterské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, 2014-2016)
 - Jan Eliáš (bakalářské studium, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká Fakulta, 2016-2017)
- Pokroky v Molekulární Biologii a Genetice (2013), Univerzita Karlova v Praze, přednáška o programovatelných nukleázách
- Pokroky v Molekulární Biologii (2014), Jihočeská univerzita, přednáška o programovatelných nukleázách
- Programmable nucleases in Mouse Models (2014), Oulu, Finsko, přednáška o programovatelných nukleázách
- Pokroky v Molekulární Biologii a Genetice (2015), Univerzita Karlova v Praze, přednáška o programovatelných nukleázách

Curriculum Vitae (in English)

Name: Petr Kašpárek
Date of Birth: 13.8.1985
E-mail: kasperek.cz@gmail.com

Education

10/2010 – present: PhD student, Charles University in Prague, Faculty of Natural Science
Institute of Molecular Genetics of the CAS, Prague
10/2008 – 02/2010 Master studies, Charles University in Prague, Faculty of Natural Sciences
Cellular and Developmental biology
10/2006 – 07/2008 Bachelor studies, Charles University in Prague, Faculty of Natural Sciences
Molecular biology and Biochemistry of Organisms

Work Experience

10/2010 – present Researcher (as PhD student), Institute of Molecular Genetics of the CAS,
Laboratory of Transgenic models of diseases
10/2008 – 07/2010 Researcher (as undergraduate student), Institute of Molecular Genetics of
theCAS, Laboratory of Transgenic models of diseases

Teaching Experience

- Supervision of bachelor and master degree students (2011-2016)
 - Radmila Haneckova (bachelor thesis, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, 2013-2014)
 - Radmila Haneckova (diploma thesis, Faculty of Sciences, Charles University in Prague 2014-2016)
 - Jan Elias (bachelor thesis, Faculty of Sciences, Charles University in Prague, 2016-2017)
- Lectures on Programmable nucleases at Charles University, Prague/Institute of Molecular Genetics, Prague, Course - Advances in Molecular Biology (2013)
- Lecture on TALEN technology at the University of South Bohemia, Advances in Molecular Biology (2014)
- Lecture at Biocentre Oulu, Finland, Programmable nucleases in Mouse Models (2014)
- Lecture on TALEN and CRISPR/Cas9 technology at Charles University, Prague/Institute of Molecular Genetics, Prague, Course - Advances in Molecular Biology (2015)

List of publications/ Seznam publikací

1. Publications used as foundation for Ph.D thesis/ Publikace jež jsou podkladem disertační práce

Kaspárek P, Krausová M, Hanecková R, Kriz V, Zbodaková O, Korinek V and Sedláček R (2014) Efficient gene targeting of the Rosa26 locus in mouse zygotes using TALE nucleases. *FEBS Letters* 588(21):3982-8. (IF5=3.478)

Kaspárek P, Ileninová Z, Hanecková R, Kanchev I, Jenicková I and Sedláček R (2016) A viable mouse model for Netherton syndrome based on mosaic inactivation of the Spink5 gene. *Biological Chemistry* [Epub ahead of print]. (IF5=2.664)

Kaspárek P, Ileninová Z, Zbodaková O, Kanchev I, Benada O, Chalupský K, Brattsand M, Beck I and Sedláček R (2017) KLK5 and KLK7 ablation fully rescues lethality of Netherton Syndrome-like phenotype. *PLOS Genetics* [Epub ahead of print]. (IF5=7.481)

2. Publications not related to Ph.D thesis/ Publikace bez vztahu k tématu disertace

Kaspárek P, Krenek P, Buryová H, Suchanová S, Beck IM, Sedláček R. (2012). "Transgenic mouse model expressing tdTomato under involucrin promoter as a tool for analysis of epidermal differentiation and wound healing" *Transgenic research* 21(3): 683-689. (IF5=2.099)

Brauer R, Turecková J, Kanchev I, Khoylou M, Skarda J, Procházka J, Spoutil F, Beck IM, Zbodaková O, Kaspárek P, Korinek V, Chalupský K, Karhu T, Herzig KH, Hajduch M, Gregor M, Sedláček R (2016) "MMP-19 deficiency causes aggravation of colitis due to defects in innate immune cell function" *Mucosal Immunology* 9(4):974-85. (IF5=6.423)

Seipold L, Damme M, Prox J, Rabe B, Kaspárek P, Sedláček R, Altmeppen H, Willem M, Boland B, Glatzel M, Saftig P. (2017) "Tetraspanin 3: A central endocytic membrane component regulating the expression of ADAM10, presenilin and the amyloid precursor protein" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research* 1864(1): 217-230 (IF5=5.261)

