

STRESZCZENIE

KLF1 (Krüppel-like factor 1) jest erytroidalnym czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w różnorodne etapy tworzenia czerwonych krwinek. KLF1 odgrywa kluczowe funkcje na etapie progenitora megakariocytów-erytrocytów, gdzie zaangażowany jest w rozwój linii erytrocytów. Uczestniczy podczas globalnej ekspresji genów erytrocytów odgrywając bezpośrednią rolę w przełączaniu globiny. KLF1 bierze też udział podczas końcowego dojrzewania erytrocytów, kontrolując wyjście z cyklu komórkowego, jak też proces enukleacji. KLF1 ma on budowę domenową: N-końcowa transaktywacyjna oraz C-końcowa domena wiążąca DNA. W genie *KLF1* opisano wiele mutacji, które prowadzą do powstania całego spektrum fenotypów: od klinicznie nieistotnych zmian morfologicznych, przez łagodne zmiany, aż po ciężkie stany patologiczne. Dwie mutacje mają charakter dominującym. Jedna występuje u myszy i powoduje anemię noworodkową ze sferocytozą wrodzoną (Nan), druga u ludzi i prowadzi do wrodzonej anemii dyserytropoetycznej typu IV (CDA).

WPROWADZENIE

KLF1 należy do czynników typu C2H2 stanowiących najliczniejszą klasę czynników transkrypcyjnych z palcami cynkowymi u eukariotów. Nazwa pochodzi od motywu Cys2-His2 w ich domenach wiążących DNA, które koordynują jon cynku i w ten sposób ustabilizują ich strukturę. Oddziaływanie palców cynkowych z DNA zachodzi poprzez większy rowek w DNA i jest specyficzne dla danej sekwencji nukleotydowej.

Biorąc pod uwagę znaczenie KLF1 podczas erytropoezy, nie jest zaskakujące, że mutacje w locus *KLF1* u myszy i człowieka powodują zmiany i zaburzenia hematologiczne. Różnią się one pod względem nasilenia w zależności od charakteru mutacji.

Struktura pojedynczego palca cynkowego zawiera dwie beta-kartki i jedną alfa-helisę, które utrzymują atom cynku. Koordynacja cynku odbywa się poprzez oddziaływanie z dwiema histydynami i dwiema cysteinami (Ryc. 1A). Cztery reszty aminokwasowe umiejscowione względem początku α -helisy w pozycjach: -1, +2, +3 i +6, każdego palca cynkowego odpowiadają za oddziaływanie z DNA (Ryc. 1A). Jak przedstawiono na rycinie 4B aminokwasy w pozycjach -1, +3 i +6 (nazywane XYZ) wiążą się z kolejnymi nukleotydami, a aminokwas przy pozycji +2 tworzy wiązanie z przeciwną nicią lub odgrywa pośrednią rolę w wiązaniu DNA [1,2]. KLF1, tak jak inne białka z rodziny KLF, rozpoznaje miejsca regulatorowe genów zawierające motywy -GC bogate lub miejsca CACCC, jednak w rzeczywistości, czynnik transkrypcyjny KLF1 oddziałuje bezpośrednio z przeciwną, bogatą w guaniny nicią DNA (Ryc. 1B).

Na podstawie badań z wykorzystaniem modelowania i genów reporteryjnych wyznaczono motyw konsensusowy, rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny KLF1: 5'-NGG-GNG-NGG-3' [3]. Motyw z czasem został dopracowany przy użyciu eksperymentu EMSA (ang. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) [4] oraz ChIP-seq (ang. *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*). Uściślono jego sekwencję, gdzie N z pozycji 5. został zawężony do cytozyny i tyminy, natomiast w pozycji 7. do guaniny lub tyminy. (5'-NGG-GC/TG-G/TGG-3') [5]. Taki motyw DNA znajduje się w wielu promotorach oraz regionach wzmocnienia transkrypcji genów linii erytroidalnej, co wskazuje na rolę KLF1 podczas procesów powstawania i dojrzewania erytrocytów [6].

MUTACJE W GENIE KLF1 ZWIĄZANE Z ZABURZENIAMI ORAZ CHOROBY HEMATOLOGICZNYMI

Odkryto wiele mutacji w genie *KLF1*, które prowadzą do powstania całego spektrum fenotypów: od klinicznie nieistotnych zmian morfologicznych, przez

dr Klaudia Kulczyńska-Figurny¹,

dr hab. Mirosława Siatecka²✉

¹Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

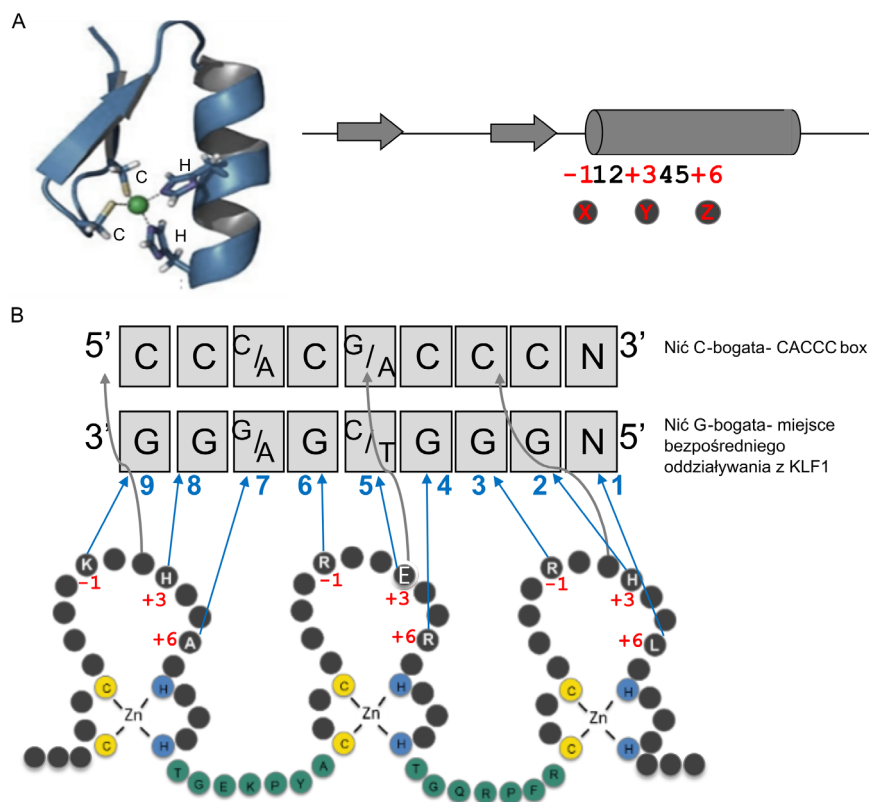
²Zakład Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2017_614

✉ autor korespondujący: msiatecka@amu.edu.pl

Słowa kluczowe: KLF1, erytropoeza, warianty KLF1, choroby hematologiczne, Nan, CDA

Wykaz stosowanych skrótów: KLF1 – Krüppel-like factor 1; HPFH – dziedziczne utrzymywanie się hemoglobiny płodowej (ang. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*); Nan – anemia noworodkowa (ang. *neonatal anemia*); CDA – wrodzona anemia dyserytropoetyczna (ang. *Congenital Dyserythropoietic Anemia*)



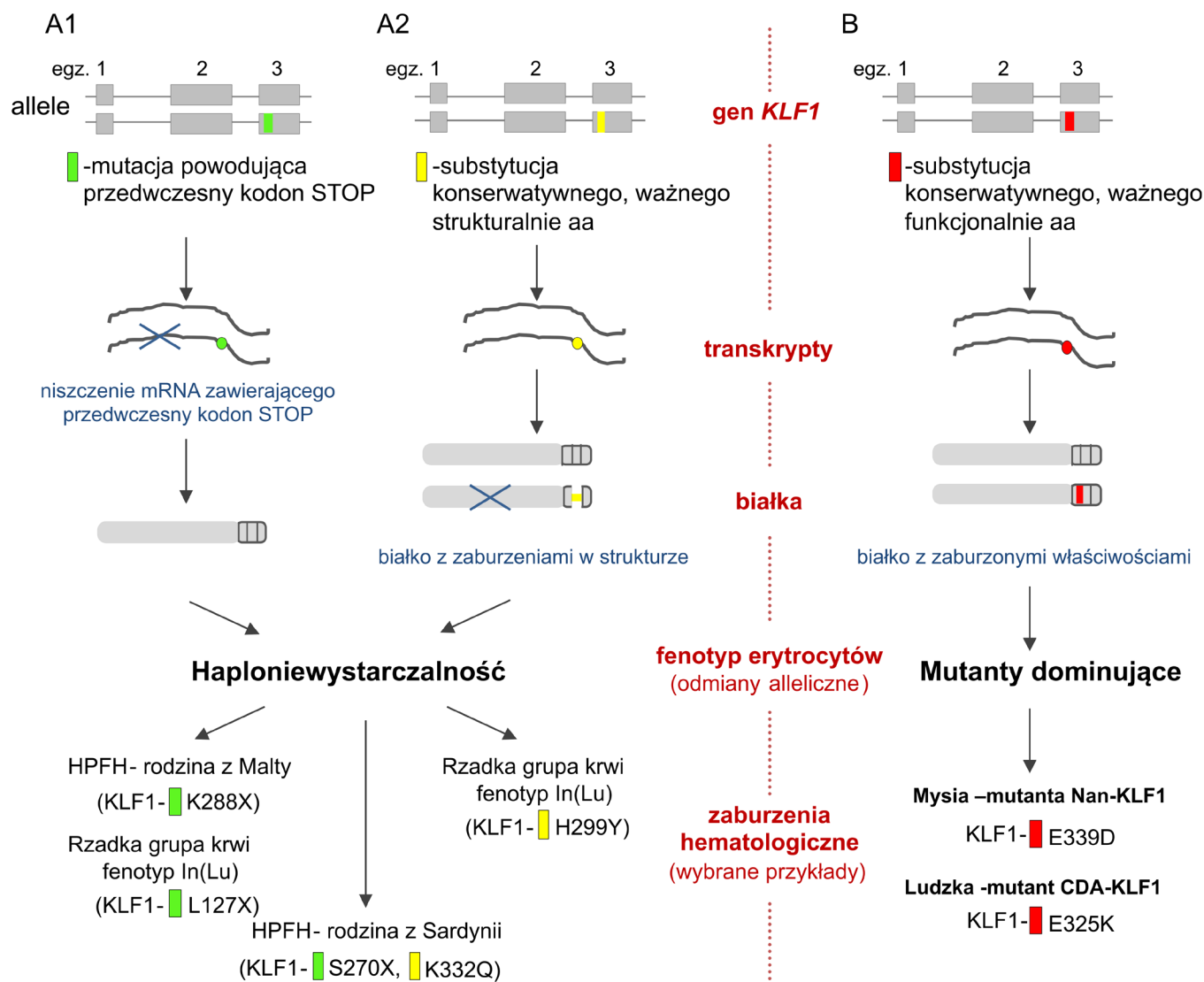
Rycina 1. Struktura oraz motyw z jakim oddziałują palce cynkowe białka KLF1. Model palca cynkowego KLF1, o typie C2H2, gdzie dwie cysteiny zlokalizowane w obrębie β -kartki i dwie histydyny zlokalizowane w obrębie α -helisy koordynują atom cynku (zaznaczony jako zielone kółko) co stabilizuje strukturę palca cynkowego (sekwencja palca cynkowego KLF1 pochodzi z bazy NCBI; model wygenerowany w programie PyMOL). Pojedynczy palec cynkowy składa się z dwóch β -kartek (szare strzałki) oraz jednej α -helisy (szary walec) w której znajdują się kluczowe dla oddziaływania z DNA pozycje XYZ (zaznaczone na czerwono). Schemat trzech palców cynkowych białka KLF1 wiążących motyw konsensusowy DNA. Każdy z palców cynkowych oddziałuje z trzema nukleotydami na nici G-bogatej poprzez aminokwasy w pozycjach -1, +3 i +6 (pozycje XYZ, zaznaczone na czerwono) oraz z jednym nukleotydem na nici C-bogatej poprzez aminokwas w pozycji +2 (sekwencja DNA za [5]). Pozycje z którymi oddziałuje KLF1 na nici G-bogatej zostały ponumerowane od 1-9 (w kierunku 5'-3').

łagodne zmiany, aż po ciężkie stany patologiczne [7]. Mutacje w genie KLF1 można podzielić na dwie zasadnicze kategorie, w zależności od fenotypu jaki w ich konsekwencji powstanie (Ryc. 2). Kategorię pierwszą stanowią mutacje prowadzące do niewystarczalności jednego z alleli genu *KLF1*. Należą tutaj mutacje: (1) prowadzące do włączenia przedwczesnego kodonu STOP, a w konsekwencji do powstania wadliwego transkryptu kierowanego na drogę degradacji (Ryc. 2 A1), (2) zmieniające strukturalnie ważny aminokwas przez co powstaje zaburzone czynnościowo (nieaktywne) białko (Ryc. 2 A2). Kategorię drugą stanowią mutacje dominujące, powodujące substytucję konserwatywnego, istotnego funkcjonalnie aminokwasu (Ryc. 2B). Do tej pory odkryto dwie mutacje dominujące w KLF1, obie zlokalizowane w drugim palcu cynkowym. Prowadzą one do ciężkich anemii u myszy i u ludzi [4,8].

HAPLONIEWYSTARCZALNOŚĆ JEDNEGO ALLELU GENU KLF1

Wykazano, że zarówno podczas fali erytropoezy pierwotnej jak i definitywnej brak jednego allelu *KLF1* (heterozygoty +/-) prowadzi do nieprawidłowości w obrębie niektórych genów kontrolowanych przez KLF1, takich jak *BCAM*, *Bcl11A*, *HBD*, *HBA2*, wrażliwych na obniżony poziom KLF1. Haploniewystarczalność KLF1 może być generowana w dwojaki sposób: (1) w wyniku mutacji prowadzącej do wprowadzenia przedwcześnie kodonu STOP

lub (2) poprzez mutację, w której dochodzi do substytucji konserwatywnego strukturalnie istotnego aminokwasu (Ryc. 2, odpowiednio A1 i A2). W obu przypadkach tylko z jednego allelu powstanie prawidłowe białko KLF1. Oba typy mutacji są związane z zaburzeniami w obrębie układu grup krwi typu Lutheran (układ luterński - LU). Lutheran system grup krwi obejmuje co najmniej 25 antygenów na powierzchni erytrocytów, które są przenoszone na dwóch izoformach glikoproteiny - podstawowej cząsteczki adhezyjnej BCAM (ang. *basal cell adhesion molecule*) [9]. Oba opisane typy mutacji związane z haploniewystarczalnością prowadzą do pojawienia się dziedzicznego fenotypu związanego z grupą krwi typu In(Lu) (ang. *inhibitor of Lutheran*) Lu(a-b-). Fenotyp ten wynika z braku ekspresji genu *BCAM*, aktywowanego przez KLF1, kodującego cząsteczkę adhezyjną BCAM [10]. Do tej pory opisano ponad 60 przypadków mutacji w KLF1 powodujących jego haploniewystarczalność, a w konsekwencji obecność grupy krwi typu In(Lu) (OMIM #111150) [11]. Poza fenotypem In(Lu) oba opisane typy mutacji prowadzące do haploniewystarczalności KLF1 mogą wywoływać inny łagodny fenotyp, charakteryzujący się wysokim poziomem hemoglobiny płodowej w życiu dorosłym (OMIM #613566) HPFH (ang. *hereditary persistence of fetal hemoglobin*) [12]. W tym przypadku wrażliwy na niedobór KLF1 jest gen *Bcl11A* represor γ -globiny.



Rycina 2. Mechanizm łączący mutacje w genie *KLF1* z ich wpływem na fenotyp erytrocytów. Przepływ informacji genetycznej od dwóch alleli *KLF1* przez transkrypty mRNA i białka, aż do powstającego fenotypu i zaburzeń hematologicznych. Haploniewystarczalność *KLF1* powstaje w następstwie: (A1) mutacji (na zielono) prowadzących do włączenia przedwczesnego kodonu STOP i degradacji wadliwego transkryptu; (A2) mutacji (na żółto) prowadzących do substytucji strukturalnie ważnego aminokwasu i powstania nieaktywnego białka. (B) Mutacja (na czerwono) zmienia funkcjonalnie ważny aminokwas i prowadzi do powstania dominującego fenotypu. Pozycje mutacji zaznaczono symbolicznie (zmodyfikowano za [51]).

MUTACJE DOMINUJĄCE W *KLF1*

Najcięższy fenotyp powstaje w wyniku mutacji dominujących, w których zastępowany jest funkcjonalnie ważny aminokwas, co prowadzi do translacji białka o zmienionych właściwościach (Ryc. 2B). W genie *KLF1* opisano do tej pory dwie mutacje dominujące. Obie znajdują się w wysoce konserwatywnym regionie drugiego palca cynkowego: R₁-E-R₂ (arginina₁-kwas glutaminowy-arginina₂) (Ryc. 3), zaangażowanego w interakcje z DNA (Ryc. 1B). Pierwsza z nich to występująca u myszy mutacja E339D prowadząca do anemii noworodkowej ze sferocytozą wrodzoną (Nan, ang. *neonatal anemia*), a druga to mutacja E325K występująca u ludzi i prowadząca do powstawania ciężkiej anemii dyserytropoetycznej typu IV CDA (ang. *Congenital Dyserythropoietic Anemia*, Ryc. 3). Pozycje E339 i E325 są ekwiwalentne (to ten sam aminokwas w drugim palcu cynkowym *KLF1*).

NEONATALNA ANEMIA U MYSZY ZE SFEROCYTOZĄ WRODZONĄ

Anemia noworodkowa (Nan) została zidentyfikowana u potomstwa myszy w trakcie przesiewowych badań genetycznych z wykorzystaniem czynnika mutagennego: ENU (N-etylo-N-nitrozomocznik). Mutacja Nan została po raz pierwszy opisana w 1983 roku, zaś 1986 roku została określona jej lokalizacja na chromosomie 8 przez Mary Lyon [13,14]. Ponownie zainteresowano się nią w 2009 roku, jako modelem do badań nad anemią hemolityczną ze sferocytozą wrodzoną, która jest często występującą dziedziczną anemią u ludzi [15]. Zaobserwowano, że mutacja jest dziedziczona autosomalnie dominująco. Czterdzieści trzy procent potomstwa myszy Nan/+ parowanych z myszami typu dzikiego rodziło się z mutacją Nan [15]. Co ważne, homozygoty Nan, podobnie jak heterozygoty Nan/+, zamierają w dniu embrionalnym 10-11 (Ryc. 4A) [4,16]. Myszy

	[-----ZF1-----]	[-----ZF2-----]	[-----ZF3-----]
pies	KRQAAMCTHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWDGCGWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGQRPFCQLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
krowa	KRQAAMCTHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWDGCGWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGQRPFCQLCSRAF SRSDHLALHMKRHL
szympan	KRQAAMCAHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWEGCGWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGQRPFCQLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
makak	KRQAAMCAHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWEGCGWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGQRPFCQLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
szczur	KRQAAMCGHEGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACSWDGCNWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGHRPFCCLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
mysz	KRQAAMCGHEGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACSWDGCNWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGHRPFCCLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
Nan	KRQAAMCGHEGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACSWDGCNWRFA	RSD	DLTRHYRKHTGHRPFCCLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
człowiek	KRQAAMCAHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWEGCGWRFA	RSD	ELTRHYRKHTGQRPFCQLCPRAF SRSDHLALHMKRHL
CDA	KRQAAMCAHPGCGKSYTKSSHLKAHLRTHTGKPYACTWEGCGWRFA	RSD	KLTRHYRKHTGQRPFCQLCPRAF SRSDHLALHMKRHL

Rycina 3. Przyporównanie sekwencji aminokwasowych trzech palców cynkowych KLF1 u ssaków. Aminokwasowy region R1-E-R2 drugiego palca cynkowego KLF1 charakteryzuje się wysoką konserwatywnością u ssaków (na żółto). W przypadku mutacji dominujących w *KLF1* kwas glutaminowy (E) w tym regionie ulega substytucji: kwasem asparaginowym w przypadku mutacji Nan (na niebiesko), lizyną w przypadku mutacji CDA (na czerwono) (zmodyfikowano za [16]).

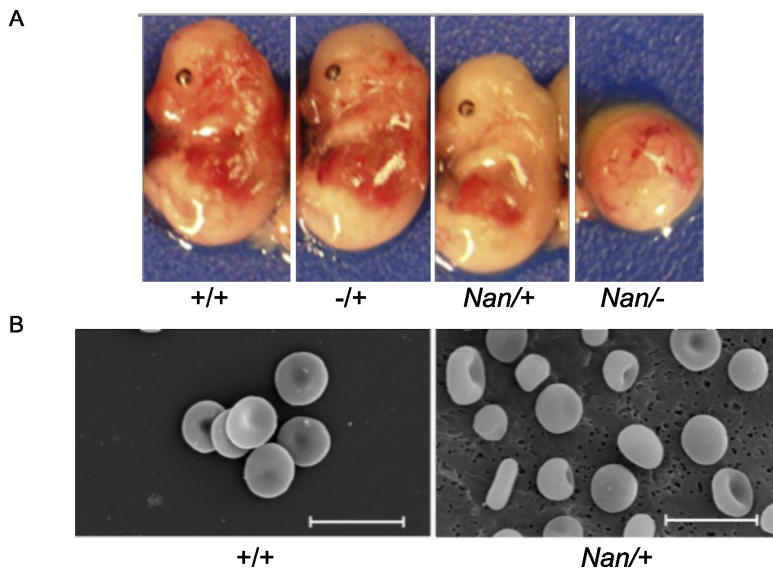
Nan/+ rodzą się blade i wykazują cechy anemii noworodkowej ze sferocytozą (Ryc. 4). Ciężki fenotyp powodował śmiertelność znacznej części młodych myszy w wyniku niedokrwistości jeszcze na etapie karmienia przez matkę. Osobniki, które przeżyły ten okres charakteryzowały się anemią utrzymującą się, także w życiu dorosłym.

Erytrocyty myszy Nan/+, cechują się zaburzonym kształtem (sferocyty) i są wrażliwe na stres osmotyczny (Ryc. 4B). Zaś elektroforeza wypreparowanych błon erytrocytów osobników z mutacją Nan, wykazała obniżony poziom białek: band3, Epb4.1, Epb4.2, dematyny, β -adducyny i p55, w porównaniu z erytrocytami zdrowych myszy [4]. U myszy Nan/+ obserwowano także akumulację żelaza w wątrobie i śledzionie oraz znaczne ilości protoporfiryny związanej z cynkiem [4,15].

Sekwencjonowanie pozwoliło na zlokalizowanie mutacji Nan w genie *KLF1*, gdzie kodon GAA (kwas glutaminowy) został zamieniony na GAT (kwas asparaginowy) w wyniku transwersji adeniny na tyminę w egzonie 3 [16]. Mutacja Nan w sekwencji aminokwasowej występuje w pozycji 339 (E339D), która znajduje się w drugim palcu cynkowym i jest częścią wysoce konserwatywnego regionu arginina – kwas glutaminowy – arginina (R-E-R) (Ryc. 3), gdzie każdy z wymienionych aminokwasów to odpowiednio pozycje -1, +3 i +6 w α -helisie, opisane wcześniej jako odpowiedzialne za oddziaływanie palca cynkowego z tripletem nukleotydów (Ryc. 1B). Kwas glutaminowy (pozycja +3 α -helisy) w pozycji 339 odpowiedzialny jest za rozpoznawanie i wiązanie cytozyny, bądź tyminy na zasadzie oddziaływań Van der Waalsa w piątej pozycji motywu DNA wiązanego przez WT-KLF1 (Ryc. 1B). Zamiana kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy w pozycji E339, powoduje zaburzenie oddziaływania tego miejsca z DNA. Kwas asparaginowy rozpoznaje jedynie cytozynę w piątej pozycji motywu DNA [4]. Takie zawężenie możliwości wiązania się do sekwencji regulatorowych genów docelowych wpływa na funkcjonowanie całego organizmu.

Początkowo motyw DNA rozpoznawany i wiązany (optymalny) dla mutantu Nan-KLF1: 5'-NGG-GCG-KGG-3', wyznaczono za pomocą eksperymentu EMSA [4]. W 2017 roku skonstruowano model komórkowy z indukowaną ekspresją mutantu Nan, co pozwoliło na wykonanie analiz ChIP-seq i udokładnienie motywu wiązania DNA: 5'-NGG-GC/AN G/TGG-3' [17]. Nowy motyw DNA dla mutantu Nan pozwala na wiązanie, nie tylko cytozyny, ale i adeniny w pozycji piątej, a także rozszerza możliwości wiązania jakiegokolwiek nukleotydu w pozycji szóstej, w przeciwieństwie do WT-KLF1, który rozpoznaje jedynie guaninę w szóstej pozycji. Degeneracja motywu DNA dla Nan-KLF1, obserwowana w pozycji szóstej, powoduje zwiększenie się liczby miejsc wiązania dla tego mutantu występujących w genomie. Rozszerzenie możliwości rozpoznawania i wiązania sekwencji prowadzi do ektopowej aktywacji genów neomorficznych charakterystycznych tylko dla mutantu Nan-KLF1.

Badania transkryptomiczne z wykorzystaniem wątrób płodowych myszy Nan/+ wykazały, że około 80 genów, ulega znacznie zawyżonej ekspresji w porównaniu z transkryptomem myszy +/- [17]. Wśród tych genów, znaleziono dwa, które kodują białka sekrecyjne – hepcydynę (*Hamp*) oraz IRF7 (*Irf7*, ang. *interferon regulatory factor 7*). Hepcydyna wiążąc się z ferroportyną reguluje gospodarkę żelaza i ulega ekspresji w komórkach wątroby [18]. Siódmy czynnik regulujący interferon (IRF7) jest czynnikiem transkrypcyjnym uczestniczącym w odpowiedzi immunologicznej poprzez aktywację interferonu β (IFN β), produkowanym w makrofagach [19]. Białka te biorą udział w obserwowanej anemii w dwojaki sposób: (1) ektopowe aktywowanie hepcydyny i obniżenie poziomu erytroferonu prowadzą do zmniejszenia produkcji czerwonych krwinek w wyniku obniżonej dostępności żelaza w komórkach, (2) ektopowa ekspresja IRF7 indukuje ekspresję IFN β , który powoduje zahamowanie rozwoju komórek erytroidalnych. Organizm myszy z mutacją Nan reaguje obronnie indukując produkcję erytropoetyny w celu zwiększenia produkcji czerwonych krwinek, czego konsekwencją jest obserwowana splenomegalia [20]. Jednakże jest to działanie daremne, ponieważ nowo



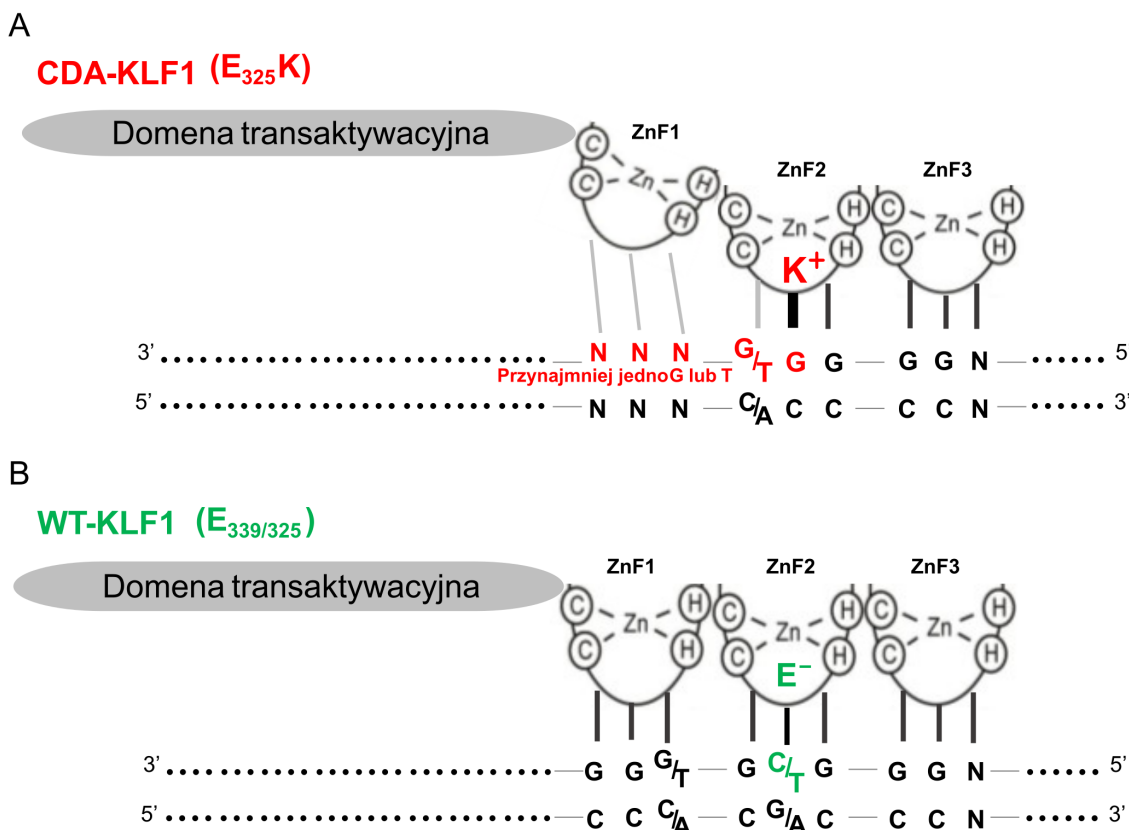
Rycina 4. Porównanie zdrowych osobników z myszami z mutacją Nan-KLF1. Porównanie morfologii zarodków mysich pobranych dnia E14.5. Zarodki WT (+/+) oraz (+/-) były identyczne fenotypowo, Nan/+ rozwijały się prawidłowo, ale obserwowano ich błądność, natomiast Nan/- wykazywały wady dysmorficzne (zmodyfikowano za [16]). Obraz erytrocytów z mikroskopu elektronowego, porównujący komórki homozygoty dominującej (+/+) oraz heterozygoty z jednym allelem niosącym mutację Nan (Nan/+). Skala 8,57 μm . (zmodyfikowano za [15]).

produkowane krwinki wydzielają hepcydynę oraz IFN β , co prowadzi do sprzężenia zwrotnego i ponownej indukcji erytropoetyny [20]. Ektopowa aktywacja nowych genów docelowych przez mutantą Nan-KLF1, może się wydawać zaskakująca, ponieważ nietypowe miejsca rozpoznawane przez Nan-KLF1 nie są łatwo dostępne w komórkach erytroidalnych. Niektóre czynniki transkrypcyjne mogą pełnić pionierską rolę tj. „otwierać” ściśle upakowaną chromatinę, aby ułatwić przyłączanie innych czynników transkrypcyjnych i kofaktorów, aby umożliwić transkrypcję. Do tej pory nie potwierdzono jednoznacznie pionierskiej roli Nan-KLF1, jednak w przypadku innego, blisko spokrewnionego, białka z rodziny KLF – KLF4 zaobserwowano taki mechanizm. Palce cynkowe 2 i 3 białka KLF4 wspierają pionierską rolę w rozpoznawaniu miejsc wiązania DNA upakowanego w nukleosom [21]. W przypadku Nan-KLF1 mutacja znajduje się w 2. palcu cynkowym i może pomagać w rozpoznawaniu nietypowych miejsc w genach, które przypuszczalnie są niedostępne dla WT-KLF1 [20].

DZIEDZICZNA ANEMIA DYSERYTROPOETYCZNA U LUDZI TYPU IV

Dyserytropoeza to zespół objawów wynikających z nieprawidłowej produkcji komórek linii erytroidalnej w szpiku kostnym, charakteryzujący się obecnością komórek prekursorowych krwi o nieprawidłowej budowie morfologicznej. Terminu tego użyto po raz pierwszy, aby opisać wrodzone anemie dyserytropoetyczne CDAs (ang. *Congenital Dyserythropoietic Anemias*). W roku 1967 Heimpel i Wendt stworzyli klasyfikację zakładającą podział na trzy typy anemii CDA (CDA I, II i III) [22]. U pacjentów z CDA typu I znaleziono mutację w genie *CDAN1* [23]. Mutacja w genie *SEC23B* występuje u pacjentów z CDA typu II [24], zaś w typie III pojawia się mutacja w genie *KIF23* [25]. Obecnie wyróżnia się także inne warianty (IV-VII), do których zaliczono anemie charakteryzujące się dodatkowymi cechami, które nie pasują do pozostałych trzech typów [26].

Anemia CDA typu IV, jest związana z dominującą mutacją w genie *KLF1* [8,27]. Opisana mutacja to tranzycja guaniny w adeninę (c.973G>A) zlokalizowana w egzonie 3 genu *KLF1* [8]. Powoduje ona substytucję kwasu glutaminowego lizyną w pozycji E325 (Ryc. 3). Jest to wysoce konserwatywny aminokwas znajdujący się w drugim palcu cynkowym w pozycji +3 α -helisy, odpowiedzialny za oddziaływanie z piątym nukleotydem sekwencji konsensusowej *KLF1* i jest to ta sama pozycja co w przypadku mutacji Nan(E339D). Do tej pory w literaturze zostało opisanych dziesięć przypadków występowania tej anemii u ludzi [8,27–40]. Objawy występujące u pacjentów dotyczą ciężkiej niedokrwistości oraz hemolizy krwinek, nieprawidłowej budowy błony erytrocytów, występowania hemoglobiny płodowej, odkładania się bilirubiny i żelaza co skutkuje powiększeniem śledziony oraz wątroby. Zarówno w rozmazie krwi, jak i badaniu szpiku kostnego pacjentów występują wielojądrzaste erytroblasty, fragmenty euchromatyny połączone z błoną jądrową, nietypowe inkluzje cytoplazmatyczne oraz fragmenty wielobłonowe okalające jądro komórkowe [28]. W błonie erytrocytów nie znaleziono kanału wodnego – akwaporyny 1 oraz antygenu powierzchniowego CD44. Pacjenci różnią się pomiędzy sobą występowaniem i nasileniem objawów. Co istotne, w dwóch przypadkach zaobserwowano zaburzenia w układzie moczowo-płciowym. W pierwszym przypadku opisanym przez Arnaud i in. w 2010, był to mikropenis oraz nieprawidłowe ułożenie cewki moczowej (hypospadija), zaś w drugim przypadku obserwowano kariotyp charakterystyczny dla osobników męskich (XY), ale cechy płciowe żeńskie [34]. Drugim objawem chorobowym, spoza układu krwiotwórczego, obserwowanym u pacjentów CDA typu IV jest obniżenie wzrostu, które nie ulega poprawie nawet w przypadku podawania hormonów wzrostu [34]. Niski wzrost miało również dziecko pozbawione obu alleli *KLF1*, jednak w tym przypadku nie obserwowano nieprawidłowości w układzie moczowo-płciowym [41]. Inną cechą łączącą pacjentów z CDA typu IV jest brak fenotypu In(Lu), obecnego w przypadku utraty funkcji jednego z alle-



Rycina 5. Model obrazujący oddziaływanie białka CDA-KLF1 ze zdegenerowanym motywem DNA, dla pierwszego palca cynkowego. Schemat oddziaływania pomiędzy mutantem CDA-KLF1 (E325K, K=Lys, na czerwono), a nowo wyselekcjonowanym motywem DNA, zdegenerowanym dla pierwszego palca cynkowego (ZnF1). Oddziaływanie ZnF2 i ZnF3 z 6nt motywem DNA wystarcza do utrzymania wiązania. Schemat oddziaływania białka WT-KLF1 (E339D, D=Glu, na zielono), a znanym motywem DNA dla tego białka. Wszystkie palce cynkowe są zaangażowane w oddziaływanie z DNA.

li *KLF1* (haploniewystarczalność). Zarówno dodatkowe cechy spoza układu krwiotwórczego, jak i brak występowania fenotypu In(Lu) świadczą o tym, że mutacja ta nie jest tylko mutacją powodującą utratę funkcji białka, ale także powodującą nabywanie nowych cech przez mutant. W 2011 roku Singleton i współpracownicy analizowali powinowactwo z jakim zmutowane formy *KLF1* (w tym CDA-KLF1) oddziałują z miejscami regulatorowymi charakterystycznymi dla WT-KLF1. Większość mutantów prowadzących do powstania fenotypu In(Lu) charakteryzowała się brakiem powinowactwa do 9nt sekwencji regulatorowej z promotora genu *BCAM*, rozpoznawanej przez białko WT-KLF1. [42]. W badaniach opartych o gen reporterowy lucyferazy poprzedzony promotorem genu *BCAM* wykazano, że CDA-KLF1 aktywuje transkrypcję podobnie jak białko typu dzikiego [43]. To wskazuje, że mutacja CDA w genie *KLF1*, nie jest mutacją prowadzącą do utraty wszystkich funkcji białka, ale że dochodzi do zachowania niektórych funkcji *KLF1*. Na podstawie obserwowanego u pacjentów fenotypu poza układem krwiotwórczym można sądzić, że mutant CDA-KLF1 nabywa także nowych funkcji.

Motyw DNA dla CDA-KLF1, 5'-NGG-GGG/T-G/TG/TG/T-3, różni się od sekwencji rozpoznawanych przez WT-KLF1: 5'-NGG-GC/TG-T/GGG-3' oraz przez mutantą Nan-KLF1: 5'-NGG-GC/AN-T/GGG-3'. Motyw dla CDA-KLF1 jest unikalny, swoisty dla tego białka. Charakteryzuje się obecnością guaniny w 5. pozycji, podczas gdy WT-KLF1 rozpoznaje C/T, a Nan-KLF1 rozpoznaje C/A w tej pozy-

cji motywu DNA [4,17,44]. Drugą cechą charakterystyczną motywu jest zdegenerowanie na końcu 3' (Ryc. 5).

Degeneracja 3' końca występująca w miejscach wiązania dla CDA-KLF1 może więc mieć korzystny wpływ na funkcje mutantu jako czynnika transkrypcyjnego. Taki zdegenerowany motyw w konsekwencji może przekładać się na zmniejszenie zbyt silnych oddziaływań DNA i czynnika transkrypcyjnego hamujących proces ich dysocjacji. Degeneracja motywu DNA z jakim oddziałuje mutant CDA-KLF1 może wpływać, nie tylko na szybkość transkrypcji, ale przede wszystkim zwiększać ilość potencjalnych genów docelowych aktywowanych przez to białko [45]. Nadanie nowych (neomorficznych) cech czynnikowi transkrypcyjnemu *KLF1* stanowi podstawę zrozumienia molekularnego mechanizmu ciężkiej niedokrwistości wywoływanej przez mutację CDA.

PODSUMOWANIE

Gen *KLF1* został zidentyfikowany dziesiątki lat temu, podobnie jak jego rola w kontrolowaniu ekspresji β -globiny [46–49]. Jednak związek między mutacjami *KLF1*, a chorobami hematologicznymi został ustalony dopiero niedawno [7,50]. Jak omówiono w niniejszym przeglądzie, jest teraz jasne, że mutacje Nan- i CDA-KLF1 są związane z zaburzeniem kontroli transkrypcji regulatorów erytrocytów. Wraz z innymi nieprawidłowościami w błonie erytrocytów i enzy-
mach, prowadzą do dyserytropoezy i związanych z nią

zmian morfologicznych i patologii czerwonych krwinek. Rezultatem zarówno u myszy, jak i u ludzi jest utrzymująca się całe życie anemia, która może być zależna od transfuzji, lub związana z erytropoezą pozaszpikową, która może powodować zmiany takie jak splenomegalie. Dodatkowo mogą występować neomorficzne zmiany genetyczne, które zaburzają funkcjonowanie czerwonych krwinek. Prowadzą do uszkodzenia narządów, które następuje w rezultacie lizy czerwonych krwinek i odkładania się żelaza. Częstość występowania pacjentów z CDA typu IV może być znacznie niedoszacowana, co dodatkowo komplikuje potencjalny związek z wodniakiem płodu [41] i utratą ciąży w późnym stadium lub śmiercią noworodków bez zbadania przyczyny (omówiono w [7]). Aktywacja genów nieerytroidalnych może pomóc wyjaśnić anomalie obserwowane u chorych z CDA. Należy również pamiętać, że cynkowe palce KLF1 są zaangażowane w interakcje z białkami, czyli mutacja CDA może również zaburzyć oddziaływanie między białkami i przyczynić się do patologicznego fenotypu.

PIŚMIENNICTWO

1. Elrod-Erickson M, Benson TE, Pabo CO (1998) High-resolution structures of variant Zif268-DNA complexes: implications for understanding zinc finger-DNA recognition *Structure* 6(4):451-64
2. Wolfe SA, Nekludova L, Pabo CO (2000) DNA Recognition by Cys 2 His 2 Zinc Finger Proteins *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29(1):183-212
3. Feng WC, Southwood CM, Bieker JJ (1994) Analyses of beta-thalassemia mutant DNA interactions with erythroid Krüppel-like factor (EKLF), an erythroid cell-specific transcription factor. *J Biol Chem* 269(2):1493-500
4. Siatecka M, Sahr KE, Andersen SG, Mezei M, Bieker JJ, Peters LL (2010) Severe anemia in the Nan mutant mouse caused by sequence-selective disruption of erythroid Kruppel-like factor *Proc Natl Acad Sci* 107(34):15151-6
5. Tallack MR, Whittington T, Shan Yuen W, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, et al. (2010) A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells *Genome Res* 20(8):1052-63
6. Perkins A (1999) Erythroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet meal *Int J Biochem Cell Biol* 31(10):1175-92
7. Perkins A, Xu X, Higgs DR, Patrinos GP, Arnaud L, Bieker JJ, et al. (2016) Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants *Blood* 127(15):1856-62
8. Arnaud L, Saison C, Helias V, Lucien N, Steschenko D, Giarratana MC, et al. (2010) A Dominant Mutation in the Gene Encoding the Erythroid Transcription Factor KLF1 Causes a Congenital Dyserythropoietic Anemia *Am J Hum Genet* 87(5):721-7
9. Fraser NS, Knauth CM, Moussa A, Dean MM, Hyland CA, Perkins AC, et al. (2019) Genetic Variants Within the Erythroid Transcription Factor, KLF1, and Reduction of the Expression of Lutheran and Other Blood Group Antigens: Review of the In(Lu) Phenotype *Transfus Med Rev* 33(2):111-7
10. Singleton BK, Burton NM, Green C, Brady RL, Anstee DJ (2008) Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype *Blood* 112(5):2081-8
11. Fraser NS, Knauth CM, Schoeman EM, Moussa A, Perkins AC, Walsh T, et al. (2018) Investigation of the variable In(Lu) phenotype caused by KLF1 variants *Transfusion* 58(10):2414-20
12. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, et al. (2010) Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin *Nat Genet* 42(9):801-5
13. Lyon M, Glenister P, Loutit J, Peters J (1983) Dominant haemolytic anemia. *Mouse News Lett* 68:68
14. Lyon MFG (1986) Position of neonatal anaemia (Nan) on chromosome 8. *Mouse News Lett* 74:95
15. White RA, Sokolovsky I V., Britt MI, Nsumu NN, Logsdon DP, McNulty SG, et al. (2009) Hematologic characterization and chromosomal localization of the novel dominantly inherited mouse hemolytic anemia, neonatal anemia (Nan) *Blood Cells, Mol Dis* 43(2):141-8
16. Heruth DP, Hawkins T, Logsdon DP, Gibson MI, Sokolovsky I V., Nsumu NN, et al. (2010) Mutation in erythroid specific transcription factor KLF1 causes Hereditary Spherocytosis in the Nan hemolytic anemia mouse model *Genomics* 96(5):303-7
17. Gillinder KR, Ilsley MD, Nébor D, Sachidanandam R, Lajoie M, Magor GW, et al. (2017) Promiscuous DNA-binding of a mutant zinc finger protein corrupts the transcriptome and diminishes cell viability *Nucleic Acids Res* 45(3):1130-43
18. Ganz T (2011) Hepcidin and iron regulation, 10 years later *Blood* 117(17):4425-33
19. Ford E, Thanos D (2010) The transcriptional code of human IFN- β gene expression *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1799(3-4):328-36
20. Planutis A, Xue L, Trainor CD, Dangeti M, Gillinder K, Siatecka M, et al. (2017) Neomorphic effects of the neonatal anemia (Nan-Eklf) mutation contribute to deficits throughout development *Development* 144(3):430-40
21. Soufi A, Garcia MF, Jaroszewicz A, Osman N, Pellegrini M, Zaret KS (2015) Pioneer Transcription Factors Target Partial DNA Motifs on Nucleosomes to Initiate Reprogramming *Cell* 161(3):555-68
22. Heimpel H, Wendt F (1968) Congenital dyserythropoietic anemia with karyorrhexis and multinuclearity of erythroblasts. *Helv Med Acta* 34(2):103-15
23. Dgany O, Avidan N, Delaunay J, Krasnov T, Shalmon L, Shalev H, et al. (2002) Congenital Dyserythropoietic Anemia Type I Is Caused by Mutations in Codanin-1 *Am J Hum Genet* 71(6):1467-74
24. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Boschetti C, Barcellini W, Iurlo A, et al. (2009) Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDAIL) is caused by mutations in the SEC23B gene *Hum Mutat* 30(9):1292-8
25. Liljeholm M, Irvine AF, Vikberg AL, Norberg A, Month S, Sandström H, et al. (2013) Congenital dyserythropoietic anemia type III (CDA III) is caused by a mutation in kinesin family member, KIF23 *Blood* 121(23):4791-9
26. Iolascon A, Heimpel H, Wahlin A, Tamary H (2013) Congenital dyserythropoietic anemias: molecular insights and diagnostic approach *Blood* 122(13):2162-6
27. Singleton BK, Fairweather VS, Lau W, Parsons SF, Burton NM, Frayne J, et al. (2009) A Novel EKLF Mutation in a Patient with Dyserythropoietic Anemia: The First Association of EKLF with Disease in Man. *Blood* 114(22):162-162
28. Jaffray JA, Mitchell WB, Gnanapragasam MN, Seshan S V., Guo X, Westhoff CM, et al. (2013) Erythroid transcription factor EKLF/KLF1 mutation causing congenital dyserythropoietic anemia type IV in a patient of Taiwanese origin: Review of all reported cases and development of a clinical diagnostic paradigm *Blood Cells, Mol Dis* 51(2):71-5
29. Kohara H, Utsugisawa T, Sakamoto C, Hirose L, Ogawa Y, Ogura H, et al. (2019) KLF1 mutation E325K induces cell cycle arrest in erythroid cells differentiated from congenital dyserythropoietic anemia patient-specific induced pluripotent stem cells. *Exp Hematol* 73:25-37.e8
30. Massey G V., Chesney A, Gadgeel M, Ravindranath Y (2024) Congenital dyserythropoietic anemia type IV with KLF1 E325K mutation: A new case with dysmorphic male genitalia *Pediatr Blood Cancer* 71(6)
31. Deguise MO, Blain S, Simpson E, Liebman M, Ferretti E (2023) Congenital dyserythropoietic anemia type IV in the genetic era: A rare neonatal case report of rapid identification with a review of the literature. *Pediatr Blood Cancer* 70(5):e30245
32. Dorosh O, Bodak K, Tsybalyuk-Voloshyn I, Makukh H, Kreminska O, Hrytsiuk I, et al. (2024) Comment on: Congenital dyserythropoietic anemia type IV with KLF1 E325K mutation: A new case with dysmorphic male genitalia. Report of a second case *Pediatr Blood Cancer* 71(11)

33. Ravindranath Y, Goyette G, Buck S, Gadgeel M, Dombkowski A, Boxer LA, et al. (2011) A New Case of KLF1 G973A Mutation and Congenital Dyserythropoietic Anemia (CDA)- Further Definition of Emerging New Syndrome and Possible Association with Gonadal Dysgenesis Blood 118(21):2101-2101
34. Ravindranath Y, Johnson RM, Goyette G, Buck S, Gadgeel M, Gallagher PG (2018) KLF1 E325K-associated Congenital Dyserythropoietic Anemia Type IV J Pediatr Hematol Oncol 40(6):e405-9
35. Ortolano R, Forouhar M, Warwick A, Harper D (2018) A Case of Congenital Dyserythropoietic Anemia Type IV Caused by E325K Mutation in Erythroid Transcription Factor KLF1 J Pediatr Hematol Oncol 40(6):e389-91
36. de- la- Iglesia- Iñigo S, Moreno-Carralero MI, Lemes-Castellano A, Molero-Labarta T, Méndez M, Morán-Jiménez MJ (2017) A case of congenital dyserythropoietic anemia type IV Clin Case Reports 5(3):248-52
37. Tang W, Cai SP, Eng B, Poon MC, Waye JS, Illum N, et al. (1993) Expression of embryonic zeta-globin and epsilon-globin chains in a 10-year-old girl with congenital anemia. Blood 81(6):1636-40
38. Agre P, Asimos A, Casella JF, McMillan C (1986) Inheritance Pattern and Clinical Response to Splenectomy as a Reflection of Erythrocyte Spectrin Deficiency in Hereditary Spherocytosis N Engl J Med 315(25):1579-83
39. Parsons SF, Jones J, Anstee DJ, Judson PA, Gardner B, Wiener E, et al. (1994) A novel form of congenital dyserythropoietic anemia associated with deficiency of erythroid CD44 and a unique blood group phenotype [In(a-b-), Co(a-b-)]. Blood 83(3):860-8
40. Wickramasinghe SN, Illum N, Wimberley PD (1991) Congenital dyserythropoietic anaemia with novel intra-erythroblastic and intra-erythrocytic inclusions Br J Haematol 79(2):322-30
41. Magor GW, Tallack MR, Gillinder KR, Bell CC, McCallum N, Williams B, et al. (2015) KLF1-null neonates display hydrops fetalis and a deranged erythroid transcriptome Blood 125(15):2405-17
42. Singleton BK, Lau W, Fairweather VSS, Burton NM, Wilson MC, Parsons SF, et al. (2011) Mutations in the second zinc finger of human EKLF reduce promoter affinity but give rise to benign and disease phenotypes Blood 118(11):3137-45
43. Helias V, Saison C, Peyrard T, Vera E, Prehu C, Cartron JP, et al. (2013) Molecular Analysis of the Rare In(Lu) Blood Type: Toward Decoding the Phenotypic Outcome of Haploinsufficiency for the Transcription Factor KLF1 Hum Mutat 34(1):221-8
44. Kulczynska K, Bieker JJ, Siatecka M (2020) A Krüppel-like factor 1 (KLF1) Mutation Associated with Severe Congenital Dyserythropoietic Anemia Alters Its DNA-Binding Specificity Mol Cell Biol 40(5)
45. Kulczynska-Figurny K, Bieker JJ, Siatecka M (2020) Severe anemia caused by dominant mutations in Krüppel-like factor 1 (KLF1). Mutat Res Rev Mutat Res 786:108336
46. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F (1995) Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene Nature 375(6529):316-8
47. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH (1995) Lethal β -thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF Nature 375(6529):318-22
48. Miller JJ, Bieker JJ (1993) A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. Mol Cell Biol 13(5):2776-86
49. Donze D, Townes TM, Bieker JJ (1995) Role of Erythroid Kruppel-like Factor in Human - to -Globin Gene Switching J Biol Chem 270(4):1955-9
50. Gnanapragasam MN, Bieker JJ (2017) Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF Curr Opin Hematol 24(3):183-90
51. Siatecka M, Bieker JJ (2011) The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis Blood 118(8):2044-54

KLF1 (Krüppel-like factor 1) variants in the pathogenesis of hematological diseases

Klaudia Kulczynska-Figurny¹, Mirosława Siatecka²✉

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland

²Department of Genetics, Institute of Experimental Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

✉corresponding author: msiatecka@amu.edu.pl

Keywords: KLF1, erythropoiesis, KLF1 variants, hematological diseases, Nan, CDA

ABSTRACT

KLF1 (Krüppel-like factor 1) is an erythroid transcription factor involved in various stages of red blood cell formation. KLF1 plays key functions at the megakaryocyte-erythrocyte progenitor stage, where it is involved in the development of the erythrocyte lineage. It participates in the global expression of erythrocyte genes, playing a direct role in globin switching. KLF1 also participates in the final maturation of erythrocytes, controlling exit from the cell cycle and the enucleation process. KLF1 has a domain structure: N-terminal transactivation domain and C-terminal DNA-binding domain. Many variants (mutations) have been described in the *KLF1* gene, which lead to the development of a whole spectrum of phenotypes: from clinically insignificant morphological changes, through mild changes, to severe pathological conditions. Two mutations are dominant. One occurs in mice and causes neonatal anemia with congenital spherocytosis (Nan), the other in humans and leads to congenital dyserythropoietic anemia type IV (CDA).

