



**Kruppel Benzeri Transkripsiyon Faktör
KLF1'in HbA2 ve HbF Değeri Üzerine Etkisi**
Effect of Kruppel-like Transcription Factor KLF1
on HbA2 and HbF values

Gülüzar Özbolet¹, Abdullah Tuli¹

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, Turkey

ABSTRACT

Kruppel-like factors are a family of transcription factors capable of binding GC-rich sequences, have emerged as critical regulators of functions that play important roles in many fundamental biologic processes, including development, proliferation, differentiation and apoptosis. KLF1 (EKLF) was the first KLF member to be discovered. It is an erythroid-specific transcription factor that is essential for erythropoiesis. In this review, we first give information about the structure, functions and variants of KLF1. The effects of KLF1 on fetal hemoglobin (HbF) and hemoglobin A2 (HbA2) values will be discussed.

Key words: KLF1, HbF, HbA2, transcription

ÖZ

Kruppel benzeri faktörler, GC bakımından zengin sekansları bağlayabilen transkripsiyon faktörleri ailesidir ve gelişme, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi birçok temel biyolojik süreçte önemli rol oynayan fonksiyonların kritik düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır. KLF1 (EKLF) keşfedilen ilk KLF üyesiydi. Eritropoez için gerekli olan eritroide özel bir transkripsiyon faktörüdür. Bu derlemede, öncelikle KLF1'in yapısı, görevleri ve varyantları hakkında bilgi aktarılıp KLF1'in Fetal hemoglobin (HbF) ve Hemoglobin A2 (HbA2) değerleri üzerine etkileri tartışılacaktır.

Anahtar kelimeler: KLF1, HbF, HbA2, transkripsiyon



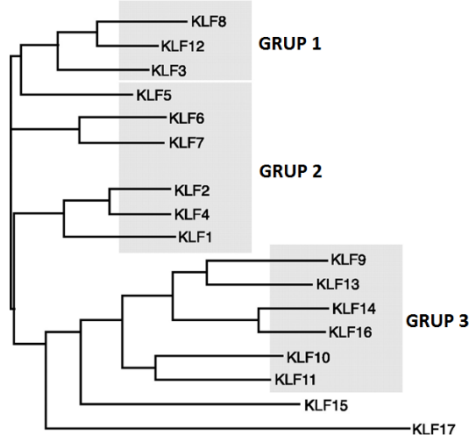
Giriş

Kruppel benzeri transkripsiyon faktör ailesi (KLF), hücrel büyüme, gelişme, farklılaşma ve aktivasyonda çeşitli rolleri olan yazılımsal düzenleyicilerdir. KLF aile üyeleri *Drosophila melanogaster*'in embriyolarında bulunan Kruppel proteininin DNA'ya bağlanan bölgesine benzerlik göstermesinden dolayı Alman araştırmacılar tarafından 'Krüppel benzeri etmenler' olarak adlandırılmışlardır. Bugüne kadar, çeşitli deneysel yaklaşımlarla tanımlanan memeli KLF ailesinin üyeleri, KLF1'den KLF17'e kadar kronolojik sıraya göre sıralanmıştır (Şekil.1). Her aile üyesi bir çinko parmak transkripsiyon faktörü varlığıyla tanımlanır. Bu nedenle, KLF'lerin diğer çinko parmak içeren proteinlerle karşılaştırıldığında ayırt edici özelliği, C-terminal ucunda ya da yakınında Cys²/His² çinko parmağından oluşan oldukça korunmuş bir DNA bağlama alanının varlığıdır. Bunun gibi, çoğu KLF'ler CACCC elemanı ve GC kutusu konsensus sekanslarını bağlayabilmektedir. Dahası, KLFler çinko parmaklar arasında oldukça korunumlu 7 kalıntı dizisi olan TGEKP'yi (Y / F) paylaşırlar. Bununla birlikte, her birinin DNA'ya bağlanmayan bölgeleri çok farklıdır ve trans-aktivasyon veya trans-baskı olarak işlev görebilirler. Bu özellikler KLF'leri büyük çinko parmak transkripsiyon faktörleri ailesinden ayırır¹⁻⁵.

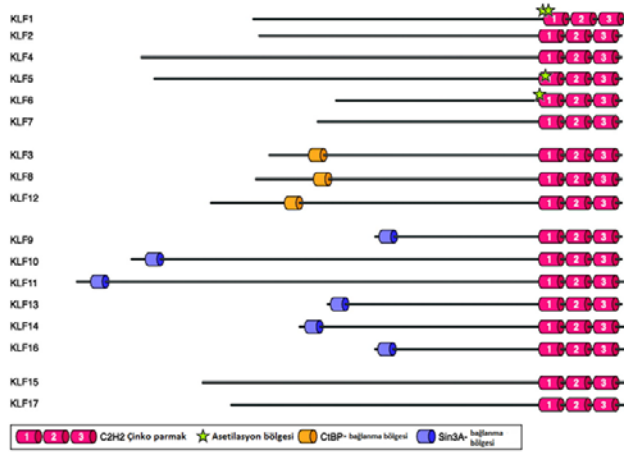
KLF gen ailesi; yapısal ve işlevsel özelliklerine göre filogenetik olarak üç alt gruba ayrılır. KLF'lerin yapısal homolojileri işlevsel benzerliklerle ilişkilidir; Bu bağlantı muhtemelen amino terminal alanlarındaki homolog protein etkileşim motiflerinden kaynaklanmaktadır. Fonksiyonel özelliklere dayanarak, KLF proteinleri üç ayrı gruba ayrılabilir (Şekil.1). Bunların protein dizilerinin filogenetik analizleri birbirleri arasındaki evrimsel farklılıkları ortaya koymaktadır. Grup 1'deki KLF'ler (KLF'ler 3, 8 ve 12), karboksi-terminal bağlayıcı protein (CtBP) ile etkileşimleri yoluyla transkripsiyonel baskılayıcı olarak görev yaparlar. Grup 2'deki aile üyeleri (KLF'ler 1, 2, 4, 5, 6 ve 7) baskın olarak transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görür (Asitilasyon bağlanma bölgeleri). Grup 3'deki KLF'ler (KLF 9, 10, 11, 13, 14 ve 16), ortak transkripsiyonel çekirdek baskılayıcı Sin3A ile olan etkileşimleri yoluyla baskılayıcı aktiviteye sahiptir (Şekil.2). KLF 15 ve 17, filogenetik analizle daha uzak bir şekilde ilişkilidir ve tanımlanmış protein etkileşim motifleri içermez⁶⁻⁹.

Bu derleme, öncelikle KLF1 hakkında bilgi verip, KLF1'in Fetal hemoglobin (HbF) ve Hemoglobin A2 (HbA₂) değerleri üzerine etkilerine odaklanacaktır. KLF1 ve yüksek fetal hemoglobin arasındaki bağlantı, Borg ve arkadaşları tarafından 2011 yılında Fetal

Hemoglobin'in kalıtsal kalıcılığı (HPFH) olan geniş bir Malta ailesi üzerinde yapılan bir çalışmada tanımlandı. Perseu ve arkadaşları tarafından yapılan maktelede de 2011 yılında ilk defa, KLF1 mutasyonlarının sınır aralığında HbA2 seviyeleri ile sonuçlandığı bildirildi^{10,11}.



Şekil 1. İnsan Krüppel benzeri faktörlerin filogenetik ağacı⁸



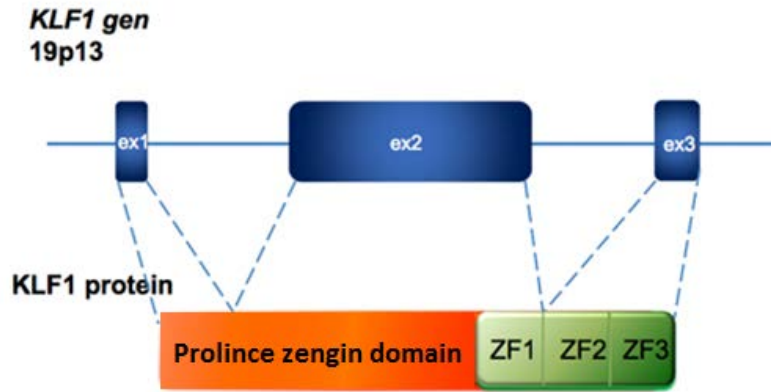
Şekil 2. İnsan KLF aile bireylerinin protein yapısı⁸

KLF1

KLF ailesinin ilk kez klonlanan ve karakterize edilen geni, Klf1/eritroid kruppel benzeri faktör (EKLF)'dir. Eritropoez için gerekli olan eritroide özel bir transkripsiyon faktörüdür. 1992 yılında KLF1 keşfedildi; KLF1 geni 19p13.2 kromozom bölgesi üzerinde bulunur, yaklaşık 3 kb genomik DNA'yı kapsar ve (362 amino asit proteini kodlayan) üç ekzondan oluşur ve iki işlevsel bölgeye sahiptir: (Şekil.4). Bir prolin zengin amino terminal bölgesi ve birçok eritroid genin düzenleyici bölgelerinde bulunan konsensüs bağlanma bölgesi motifini tanıyan bir karboksi terminal alana sahiptir. Çinko parmaklar, hedef DNA'ya bağlanmaya yardımcı olan "TGERP" benzeri motif ile birbirine bağlıdır¹²⁻¹⁴. (Şekil 3.)

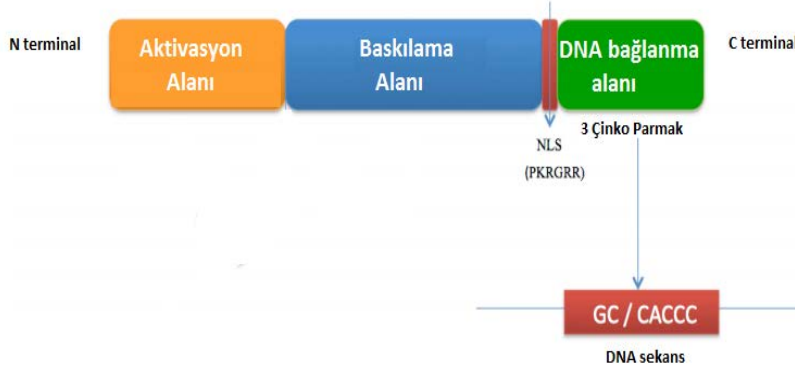


Şekil 3. KLF1 molekülünün şematik diyagramı¹⁵



Şekil 4. KLF1'in yapısı¹⁶

KLF1'in üç C-terminali C_2H_2 çinko parmağının, hem in vitro hem de in vivo genelde bir 'CACCC' motifi olarak adlandırılan bir G/C zengin DNA motifine bağlandığı gösterilmiştir (Şekil.5). KLF1'in N-ucu, p300, CBP (crebp bağlayıcı protein) ve TFIID gibi transkripsiyonel koaktivatörlerle etkileşime girdiği, çinko parmaklarının Sin3A ve HDAC1 gibi transkripsiyonel çekirdek baskılayıcılarla etkileşime geçtiği bildirilmiştir. Buna rağmen, KLF1 in vivo olarak ağırlıklı olarak bir transkripsiyonel aktivatör olarak hareket ettiği bilinmektedir¹³⁻¹⁶.



Şekil 5. DNA bağlanma alanı

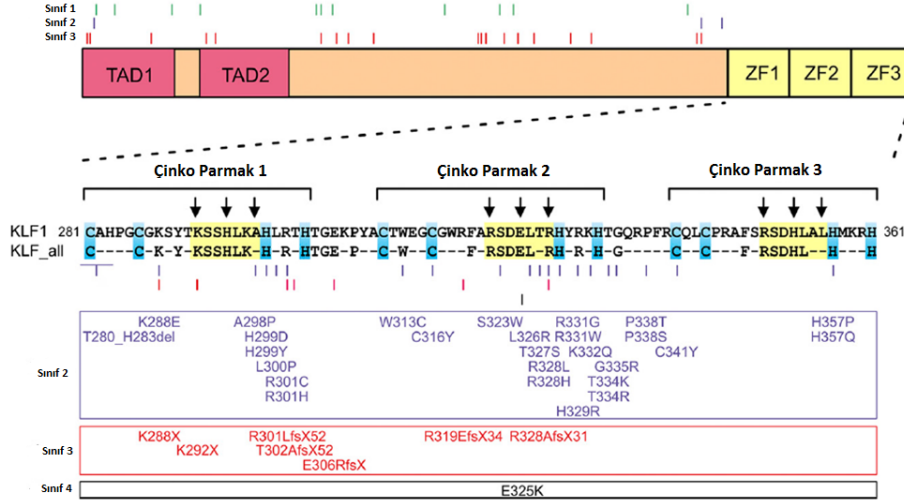
KLF1'in İşlevsel Alanları

KLF1 proteini (362 amino asit), N-terminal bölgesinde 2 tane transaktivasyon alanı içeriyor (TAD1 ve TAD2), bir transkripsiyonel aktivatör olarak çalışması için gereklidir. C ucunda KLF1'in genomdaki belirli noktalarda DNA'yı bağlamasını sağlayan 3 çinko parmak alanı (ZF1, ZF2 ve ZF3) vardır. Çinko koordinasyonunda yer alan sistein ve histidin kalıntıları mavi renkte vurgulanır; DNA ile temas eden kalıntılar sarı renkte vurgulanır. Oklar, genomdaki KLF1 bağlanma yerlerini tanıyan baza özgü temas noktaları oluşturan kalıntılara işaret ediyor. Varyantlar renk kodludur: sınıf 1, yeşil; Sınıf 2, mavi; Sınıf 3, kırmızı; Sınıf 4, siyah⁸(Şekil.6).

Hasta Fenotiplerince Tanımlanan KLF1 Varyant Sınıfları

KLF1 geninin transkripsiyonunu etkileyebilecek birkaç promoter varyantı tarif edilmiştir. Bununla birlikte, en yaygın olarak, KLF1'deki varyantlar, protein kodlayıcı dizileri değiştirir. Bu değişkenler dört fonksiyonel sınıfa ayrılabilir:

1. işlevsiz veya küçük işlevsiz varyantlar
2. düşük işlevli hipomorfik varyantlar
3. işlev kaybı varyantlar
4. baskın değişkenler



Şekil.6. KLF1'in işlevsel alanları ve literatürde bildirilen varyantları¹⁸

Sınıf 1, DNA bağlama alanı dışında bulunan missense varyantlarını temsil eder. TAD'lerdeki varyantlar KLF1 aktivitesini etkileyebilir, ancak bunlar nötr polimorfizm olarak kabul edilir. **Sınıf 2** DNA bağlama alanı içinde hemen hemen her zaman bulunur bulunan normal KLF1 işlevine müdahale eden missense varyantlarını veya küçük çerçeve kayma mutasyonlarını içerir. Bileşik heterozigot KLF1 varyantlarına sahip olan hemen hemen tüm hastalar, en az bir alel üzerinde bir sınıf 2 varyantı taşırlar. F onksiyonel KLF1'in eksikliği eritropoezi ciddi şekilde etkiler çünkü sınıf 2 varyantlarının hipomorfik alleller olduğunu gösterilmiştir. **Sınıf 3**, DNA bağlama alanını dışında çerçeve kaydırma varyantlarını içermektedir. Sadece 1 alleli etkileyen sınıf 3 varyantları fenotipik olarak hafif olan KLF1 için haploid yetersizliğe neden olur. **Sınıf 4**, ZF2, p.E325K'da oldukça korunmuş bir kalıntı değiştiren tek bir varyant ile temsil edilir. Yalnızca de novo bir varyant olarak ortaya çıkar ve baskın bir şiddetli konjenital diskritropoetik

anemi IV KLF1'in mutasyonundan kaynaklanır ve otozomal dominant bir şekilde kalıtılır^{18,19,20}.

KLF1'in HbF Değeri Üzerine Etkisi

KLF1 mutasyonlarının artmış HbF düzeylerine etkileyip etkilemediğini incelemek için Gallienne ve ark. 2011 yılında yaptığı çalışmada KLF1 genindeki mutasyonların artmış Hb F seviyeleri ile ilişkili olup olmadığını araştırdı. Hemoglobinopati araştırması için (1 ila 81 yaş arası bireyler), yüksek Hb F seviyesine (aralık%1.5-25) sahip olan toplam 131 kan örneği KLF1 mutasyonları için test edildi. Fonksiyonel olarak etkili KLF1 mutasyonları, yüksek Hb F seviyesine (%1.5-25.0) sahip 131 yetişkin örneğin 11'inde tanımlandı. Onbir farklı mutasyon tespit edildi, bunların 9'u daha önce bildirilmemişti. KLF1 mutasyonları, normal Hb F düzeyleri (<%1.0) olan 121 örnekteki eşleştirilmiş bir kohortta tanımlanmadı. Orak hücreli bir hastada, özellikle hafif bir fenotipe sahip olan%20.3'lük bir Hb F seviyesinde başka bir yeni KLF1 mutasyonu da bulundu. Ancak normal Hb F düzeyleri olan 121 hemoglobinopati tavsyesinde KLF1 mutasyonları saptanmadı. Bu, KLF1 mutasyonlarının bu hastalarda gözlemlenen artmış Hb F seviyeleri ile ilişkili olduğunu kuvvetle önerir. Saptanan tüm mutasyonlar heterozigot idi, bu da tek bir değiştirilmiş KLF1 alelinin Hb F'yi yükseltebileceğini gösteriyor. Bu, KLF1 mutasyonlarının, hemoglobinopatilerin yaygın olduğu bölgelerde HPFH'nin yaygın bir nedeni olabileceğini ve muhtemelen bu popülasyonlarda Hb F varyansına önemli bir katkı yapabileceğini gösterir. Saptanan tüm mutasyonlar heterozigot idi ve tek bir değiştirilmiş KLF1 alelinin Hb F seviyelerini yükseltmek için yeterli in vivo kanıt sağladığını ortaya koymuştur^{21,22}.

KLF1'in HbA₂ Değeri Üzerine Etkisi

Bildiğimiz üzere artmış hemoglobin A₂ (HbA₂) düzeyi, β -talasemi taşıyıcılarının saptanmasında en güvenilir hematolojik bulgu olarak kabul edilmektedir. Perseu ve arkadaşları 2011 yılında ilk kez KLF1 gen mutasyonlarının sınırda HbA₂ ve normal MCV ve MCH olan bireylerden sorumlu olduğunu bulmuşlardır. Çalışmada KLF1 mutasyonlarının sınır aralığında HbA₂ seviyeleri ile sonuçlanıp sonuçlanmadığı hipotezi test etmek için, sınırda HbA₂ ile birlikte normal MCV ve MCH ile düzeyine sahip olan deneklerin büyük bir grup içinde KLF1 dizisini sıraladık ve bu konularda tutarlı bir oranda birkaç KLF1 mutasyon tespit ettik. Sınırdaki HbA₂ ile 145 denek, HbA₂ değerleri %3.3-4.1 arasında, normal ya da biraz azalmış MCV ve MCH olarak tanımlananlar çalışıldı. Sınırdaki HbA₂'ye sahip 145 hastanın 52'inde (%35.9) KLF1 geninde heterozigot mutasyon vardı. KLF1 mutasyonları arasında, en yaygın

olanı, 42 kişide (%80.8) bulunan non-sense KLF1 p.Ser270X mutasyonu idi. Ortalama HbA2 değeri %0.2-3.6 KLF1 (çerçeve kayması)HbF, normal (%0.2) seviyeden orta derecede artmış seviyelere (%5.8) kadar oldukça değişkenlik göstermiştir. KLF1 geninin komple dizilimi, sınırda HbA2 bulunan kalan 93 kişide mutasyon saptanmadı. İki denekte P.Thr280_His283del mutasyonu, 4 denekte p.Arg319GluX34 çerçeve kayması mutasyonu, 1 denekte p.Leu326Arg, 2 denekte Thr327Ser ve 1 denekte p.Lys332Gln missense mutasyonu saptanmıştır. İki mutasyon (Thr280_His283del ve Thr327Ser) ilk defa tanımlanmadı. KLF1 geninin komple dizilimi, sınırda HbA2 bulunan kalan 93 kişide mutasyon ortaya saptanmamıştır. Bir ailede, her iki ebeveyn de KLF1 p.Ser270X mutasyonuna sahipti. Bu ailede 2 spontan ve açıklanamayan erken gebelik kesilmelerinin meydana geldiğini görmek ilginçtir. Bu hipotez test edilemez olmasına rağmen, erken gebelik kesintilerinin, KLF1 p.Ser270X mutasyonu için homozigotluk sonucu olduğu, bunun da KLF1'in tamamen yokluğu ile ilişkili olması mümkündür¹¹.

Sonuç

Bugün için KLF1 genini etkileyen mutasyonların sayısı ve bu mutasyonlarla ilişkili farklı fenotipler hakkındaki bilgiler az ve belirsizdir. KLF1, herhangi bir anemi olmadan HbF 'de mütevazı artışlara neden olmaktadır. Bu nedenle KLF1 düzeylerini azaltmak veya % 70-80 oranında işlev görmesini sağlamak anemiye neden olmaksızın HbF düzeylerini önemli ölçüde yükseltmek mümkün olabilir. Bu yüzden orak hücre hastalığı ve β -talasemi'de önemli ölçüde klinik düzelmeye sağlayacak HbF'nin yeniden etkinleştirilmesine neden olarak potansiyel bir terapötik hedef olabilir.

Aynı zamanda sınırda HbA2'ye sahip kişilerde KLF1 mutasyonlarının belirlenmesi ve klasik HBB mutasyonu ile ilişkili klinik olarak anlamlı fenotiplerin bulunmaması, taşıyıcı tespiti ve genetik danışmanlığı kolaylaştıracak ve tanımlanmasına yönelik talasemi tarama programlarına risk çiftlere önemli ölçüde katkıda bulunacaktır. Bu yüzden KLF1 mutasyonları ile ilgili değerli bilgilerin sistematik olarak toplanmasını ve hem klinik hem de araştırmacı bilim insanları tarafından erişilebilir olmasını sağlanması gerektiğini düşünüyorum.

Kaynaklar

1. Cao Z, Sun X, Icli B, Wara AK, Feinberg MW. Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood*. 2010;116:4404-14.

2. Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1996-2001.
3. Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R. Vascular implications of the Kruppel-like family of transcription factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1135-41.
4. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1-and Kruppelike transcription factors. *Genome Biol.* 2003;4:206.
5. Chen C, Benjamin MS, Sun X, Otto KB, Guo P, Dong XY. KLF5 promotes cell proliferation and tumorigenesis through gene regulation and the TSU-Pr1 human bladder cancer cell line. *Int J Cancer.* 2006;118:1346-55.
6. Bateman NW, Tan D, Pestell RG, Black JD, Black AR. Intestinal tumor progression is associated with altered function of KLF5. *J Biol Chem.* 2004;279:12093-101.
7. Van Vliet J, Turner J, Crossley M. Human Kruppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:1955-62.
8. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 2010;90:1337-81.
9. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 1993;13:2776-86.
10. Grech L, Borg J. Control of globin gene expression by Kruppel-like Factors. *Journal of The Malta Chamber of Scientists.* 2014;2:66-77.
11. Perseu L, Satta S, Moi P, Demartis FR, Manunza L, Sollaino MC, Barella S, Cao A, Galanello R. KLF1 gene mutations cause borderline HbA2. 2011;118:4454-8.
12. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature.* 1995;375:318-322.
13. Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, et al. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res.* 2010;20:1052-63.
14. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Kruppelike transcription factors. *Genome Biol.* 2003;4:206.
15. Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M, Bao S. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1996-2001.
16. Cao A. Novità sul processo di transizione (switching) HbF->HbA. *Rivista Italiana di Genetica e Immunologia Pediatrica.* 2011;3:1-10.
17. McKussick VA, Kniffin CL. Kruppel-Like Factor 1; KLF1. Available from <https://www.omim.org/KLF1/600599>. Accessed 20.2.2017.

18. Perkins A, Xu X, Higgs DR, Patrinos GP, Arnaud L, Bieker JJ, Philipson S. Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. *Blood*. 2016;127:1856-62.
19. Magor GW, Tallack MR, Gillinder KR, Bell CC, McCallum N, Williams B et al. KLF1-null neonates display hydrops fetalis and a deranged erythroid transcriptome. *Blood*. 2015;125:2405-17.
20. Raiola L, Lussier-Price M, Gagnon D, Lafrance-Vanasse J, Mascle X, Arseneault G et al. Structural characterization of a noncovalent complex between ubiquitin and the transactivation domain of the erythroid-specific factor EKLF. *Structure*. 2013;21:2014-24.
21. Gallienne AE, Dréau HMP, Schuh A, Old JM, Henderson S. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *Haematologica*, 2012;97:340-3.
22. Singleton B., Burton N., Green C., Brady R., Anstee D. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group in(lu) phenotype. *Blood*. 2008;112:2081-8.

Correspondence Address / Yazışma Adresi

Gülizar Özbolat
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,
Adana, Turkey
e-mail: guluzarozbolat@gmail.com

Geliş tarihi/ Received: 23.02.2017**Kabul tarihi/ Accepted:** 17.04.2017