

Streszczenie

Krüppel like factor 1 (KLF1) jest jednym z kluczowych czynników transkrypcyjnych, niezbędnych w trakcie powstawania i dojrzewania erytrocytów. Ma budowę domenową i zawiera: na N-końcu domenę transaktywacyjną odpowiedzialną za przyłączenie kofaktorów transkrypcji, a na C-końcu trzy palce cynkowe oddziałujące z 9 nukleotydowym motywem DNA: 5'NGG-GC/TG-NGG-3'. Opisano wiele mutacji w obrębie ludzkiego genu *KLF1*, które powodują szerokie spektrum fenotypów od łagodnych do patologicznych. Dwie z nich to mutacje o charakterze dominującym, które znajdują się w drugim placu cynkowym KLF1, w pozycji funkcjonalnie zaangażowanej w interakcje z środkowym (piątym) nukleotydem wiązanego motywu DNA. Jedna z mutacji występuje u myszy i powoduje anemię noworodkową ze sferocytozą wrodzoną (Nan), druga występuje u ludzi i prowadzi do wrodzonej anemii dyserytropoetycznej typu IV (CDA).

W niniejszej pracy badałam molekularne podstawy mechanizmu będącego podłożem anemii dyserytropoetycznej u ludzi wynikającej z mutacji CDA (E325K) w genie *KLF1*. Ze względu na bezpośrednie zaangażowanie zmutowanego aminokwasu w oddziaływanie z DNA, badania rozpoczęłam od wyznaczenia sekwencji konsensusowej, rozpoznawanej i wiązanej przez mutant CDA-KLF1. Zastosowałam w tym celu metodę *in vitro* selekcji CASTing, połączoną z sekwencjonowaniem nowej generacji i zdefiniowałam motyw dla CDA-KLF1: 5'-NGG-GGG/T-G/TG/TG/T-3'. Motyw ten, istotnie różni się od motywu rozpoznawanego przez WT-KLF1: (1) zawiera guaninę w piątej pozycji, (2) jest zdegenerowany na 3' końcu. Powyższe cechy wskazują, na wzajemnie wykluczające się preferencje wiązania mutant CDA KLF1 w porównaniu z białkiem WT-KLF1. W konsekwencji białko CDA-KLF1 ma potencjał do rozpoznawania i wiązania ektopowych miejsc regulatorowych, które nie są rozpoznawane przez WT-KLF1, prowadząc to do aktywacji tzw. genów neomorficznych.

Na podstawie genomowych analiz bioinformatycznych wykazałam, że nowy motyw wiązania dla CDA-KLF1, ze względu na znaczny stopień degeneracji, znajduje się w ponad 20 tysiącach miejsc regulatorowych genów. Wśród genów zawierających badany motyw DNA znalazły się geny docelowe dla białka WT-KLF1, czyli zawierają one miejsca wiązania dla obu wariantów KLF1. Kilka z nich wybrałam do dalszych analiz. Ze względu na brak dostępu do pacjenta z CDA typu IV, do badania poziomu transkrypcji genów, wykorzystałam system oparty o stabilne, erytroidalne linie komórkowe z indukowaną ekspresją wariantów białka WT-KLF1 lub CDA-KLF1. Dowiodłam, że mutant CDA-KLF1 aktywuje geny: *BCAM*, *E2F2*,

Cdkn1B, *TFR2*, *SLC4A1*, *IL17RB*. Badany poziom transkrypcji jest nawet wyższy niż w obecności WT-KLF1. Najciekawszym przykładem jest gen *BCAM*, należący do genów docelowych WT-KLF1, które są wrażliwe na poziom KLF1. U pacjentów z mutacjami w genie *KLF1* dochodzi do obniżonej ekspresji *BCAM*. Wyjątkiem są pacjenci z CDA typu IV, u których poziom ekspresji genu *BCAM* nie jest zaburzony. Moje badania dowodzą, że ma to związek z rozpoznawaniem przez mutant CDA-KLF1 nowo zidentyfikowanego motywu wiązania DNA znajdującego się w promotorze tego genu, w pobliżu miejsca rozpoznawanego przez WT-KLF1.

Powyższe badania podkreślają rolę funkcjonalnie istotnego aminokwasu (kwas glutaminowy -E325) bezpośrednio zaangażowanego w oddziaływanie z DNA i pokazują, że mutacja prowadząca do jego substytucji lizyną (E325K) zmienia specyficzność białka KLF1 w stosunku do rozpoznawanej 9 nt sekwencji konsensusowej DNA. Wyznaczenie i charakterystyka motywu DNA rozpoznawanego i wiązane przez CDA-KLF1 były pierwszym i niezbędnym krokiem do poznania molekularnych podstaw mechanizmu ciężkiej anemii dyserytropoetycznej typu IV. Nowy motyw DNA potwierdziłam analizami funkcjonalnymi. Mutant CDA-KLF1 uczestniczy w aktywacji transkrypcji genów posiadających w regionach regulatorowych nowo określony motyw DNA. Pośród tych genów mogą być geny neomorficzne, spoza układu hematopoetycznego, których ektopowa aktywacja tłumaczyłaby obserwowany fenotyp pacjentów z CDA typu IV.