KLF1 (Krüppel-like factor 1) jako kluczowy regulator ekspresji genów erytroidalnych

dr Klaudia Kulczynska-Figurny[1],

dr hab. Mirosława Siatecka[2]✉

[1]Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,
[2]Zakład Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

https://doi.org/10.18388/pb.2017_613

✉autor korespondujący: msiatecka@amu.edu.pl

Słowa kluczowe: KLF1, erytropoeza, czerwone krwinki, globiny, hematopoeza

Wykaz stosowanych skrótów: C2H2 – cysteina 2,histydyna 2; EryP-CFC – prymitywne komórki progenitorowe tworzące kolonie erytrocytów *(ang. EryP colony forming cell)*; GATA – czynnik transkrypcyjny GATA (ang. *GATA-binding factor*); HSC – hematopoetyczna komórka macierzysta (ang. *hematopoietic stem cell*); KLF1 – Krüppel-like factor 1; MEP – progenitor megakariocytów i erytrocytów (ang. *megakaryocyte /erythrocyte progenitor*); TAD – domena transaktywacyjna *(ang. transactive domain)*

STRESZCZENIE

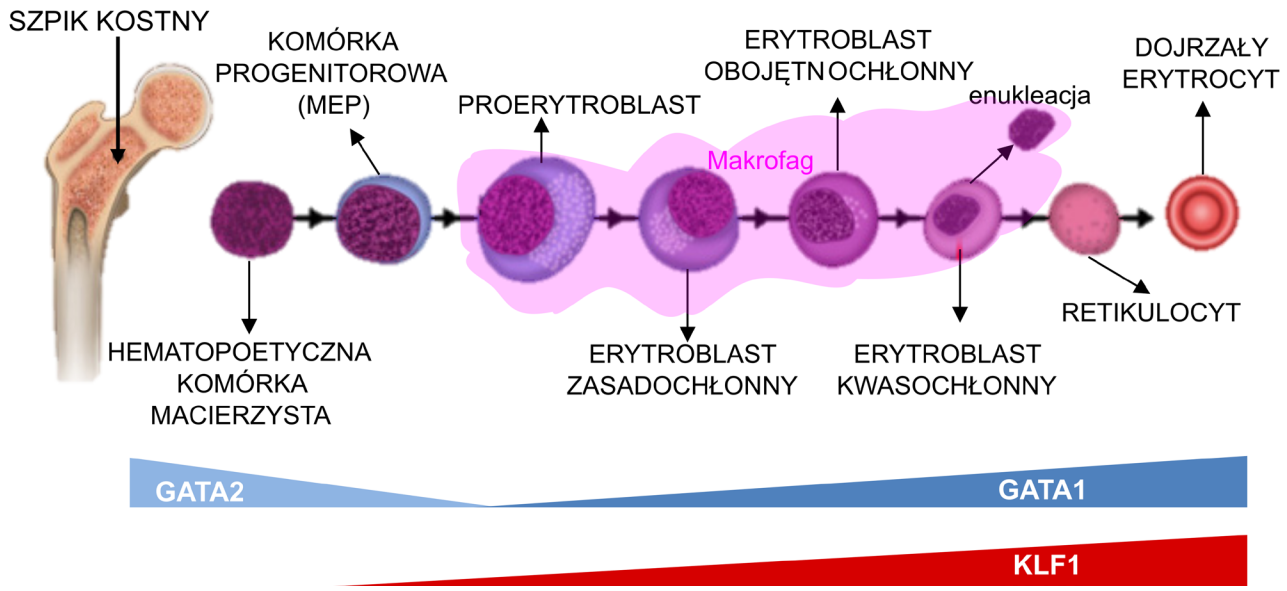
KLF1 (Krüppel-like factor 1) jest niezbędnym czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w niemal wszystkie etapy erytropoezy. KLF1 promuje przejście mieloidalnych komórek progenitorowych w kierunku rozwoju linii erytroidalnej, z jednoczesnym hamowaniem szlaku megakariopoezy. Jego ekspresja jest tkankowo specyficzna i ogranicza się do narządów krwiotwórczych. Rozpoczyna się w woreczku żółtkowym, następnie w wątrobie i szpiku kostnym płodu. KLF1 pełni rolę globalnego regulatora rozwoju i integralności erytrocytów. Reguluje wiele procesów, w tym syntezę globin, hemu, pozyskiwanie żelaza, elastyczność błony krwinek czerwonych i cytoszkieletu, cykl komórkowy i apoptozę. KLF1 tworzą dwie domeny: N-końcowa transaktywacyjna oraz C-końcowa domena wiążąca DNA. KLF1 jest pierwszym poznanym czynnikiem transkrypcyjnym z rodziny Kruppel-like Factor, która obecnie obejmuje 17 członków. Ich cechą charakterystyczną są motywy palców cynkowych typu C2H2 oddziałujące z DNA. Prócz erytropoezy czynniki KLF odgrywają kluczową rolę w regulacji ekspresji genów różnych procesów biologicznych, w tym proliferacji komórek, różnicowaniu, apoptozie.

WPROWADZENIE

Erytropoeza to proces, w którym powstają czerwone krwinki (erytrocyty) rozprowadzające tlen w organizmie. W każdej sekundzie w szpiku kostnym zdrowego, dorosłego człowieka jest produkowanych około 2,4 miliona erytrocytów. Dojrzała krwinka trafiająca do krwioobiegu pełni swoją rolę przez 120 dni po czym ulega degradacji, głównie w śledzionie [1]. Utrzymanie tego dynamicznego procesu w równowadze jest zależne od wielu czynników kontrolujących proces erytropoezy na wszystkich jego etapach, a zachowanie homeostazy pozwala na wydajny transport gazów oddechowych w organizmie.

Wczesne etapy rozwoju embrionalnego odbywają się bez obecności komórek krwi. Dojrzewający embrion jest zaopatrywany w tlen i inne niezbędne czynniki przez dyfuzję. Dopiero gdy osiągnie zbyt duży rozmiar i dyfuzja staje się niewystarczająca, pierwsze komórki układu krwiotwórczego zaczynają powstawać. Mysia hematopoeza ma swój początek w dniu embrionalnym E7,5 (w ludzkim embrionie w dniu E30) [2]. Pierwsza hematopoetyczna komórka HSC (ang. *hematopoietic stem cell*) powstaje w pozaembrionalnych wyspach krwiotwórczych w ścianie woreczka żółtkowego, a kolejne w omoczni i łożysku. Następnie komórki te migrują do łożyska i wątroby płodowej, rozpoczynając swoją największą ekspansję; następnie, tuż przed urodzeniem, migrują do śledziony i szpiku kostnego, gdzie będą produkowane po urodzeniu. Komórki HSC to samoodnawiające się prekursory zdolne do produkowania komórek, które dzielą się i dojrzewają, prowadząc do powstania wszystkich efektorowych komórek krwi, takich jak komórki limfoidalne oraz mieloidalne [3].

Proces erytropoezy dzieli się na dwie fale: pierwotną i definitywną. Fala pierwotna rozpoczyna się od pierwszych ssaczych progenitorów erytropoezy, EryP-CFC, które powstają w wyspach krwiotwórczych woreczka żółtkowego [4,5]. Progenitory EryP są wykrywalne w dniu E7,25-9 u myszy (między 3 a 4 tygodniem gastrulacji u człowieka) [6,7]. Te komórki dają początek dużym jądrzastym erytroblastom, które zaczynają krążyć w krwioobiegu od dnia E8,5 u myszy (po 4. tygodniu u człowieka) [8]. Do dnia E12,5 pierwotne erytroblasty dojrzewają do etapu ortochromatycznego. Na tym etapie podział komórek ustaje i dochodzi do enukleacji. Następnie bezjądrzasty, pierwotny retikulocyt dojrzewa do postaci czerwonej krwinki [9]. Druga fala – definitywna – rozpoczyna się u myszy około dnia E9,5 (5. tydzień rozwoju u człowieka) pojawieniem się w woreczku żółtkowym i łożysku progenitorowych komórek, które następnie migrują do wątroby płodowej, gdzie dają początek dojrzałym czerwonym krwinkom [10].



Rycina 1. Etapy dojrzewania czerwonych krwinek od hematopoetycznej komórki macierzystej, aż do dojrzałego, bezjądrzastego erytrocytu. Schemat przedstawiający rozwój linii erytroidalnej od hematopoetycznej komórki macierzystej poprzez kilka progenitorowych komórek, aż po dojrzały erytrocyt. Na etapie komórki HSC wysokiej ekspresji ulega czynnik GATA2, na etapie proerytroblastu ustępuje on miejsca GATA1, którego ekspresja trwa aż do końca dojrzewania erytrocytów. KLF1 promuje zapoczątkowanie produkcji i kontroluje ekspresje wielu genów zaangażowanych we wszystkie etapy dojrzewania erytrocytów (za [9]).

RÓŻNICOWANIE KOMÓREK ERYTROIDALNYCH

Pierwszymi komórkami progenitorowymi podczas fali definitywnej erytropoezy są BFU-E (ang. *Burst Forming Unit-Erythroid*), które pod wpływem erytropoetyny, interleukiny 3, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów, trombopoetyny oraz czynnika komórek macierzystych, produkują tysiące wypełnionych hemoglobiną erytroblastów. Kolejnymi, bardziej dojrzałymi komórkami progenitorowymi są CFU-E (ang. *Colony Forming Unit-Erythroid*), z których powstają kolejne erytroblasty. Następne etapy dojrzewania czerwonych krwinek odbywają się na wyspach erytroblastycznych, znajdujących się w wyspecjalizowanych niszach szpiku kostnego i wątroby, gdzie erytroblasty otaczają centralną komórkę makrofaga (zaznaczoną na różowo na rycinie 1) [11]. Tutaj powstają i dojrzewają jądrzaste prekursory, począwszy od proerytroblastów (ProE) przez erytroblasty zasadochłonne (bazofilne), erytroblasty wielobarwliwe (polichromatyczne), erytroblasty kwasochłonne (ortochromatyczne), aż po bezjądrzaste retikulocyty (Ryc. 1). Ostatnim etapem dojrzewania erytrocytów jest enukleacja, polegająca na fagocytozie pyrenocytu (obkurczonego jądra z niską zawartością RNA) przez komórkę makrofaga [12]. Następnie bezjądrzaste retikulocyty zmniejszają wielkość komórek, akumulują hemoglobinę i ulegają symetrycznym podziałom dając początek erytrocytom [9].

REGULACJA PROCESU ERYTROPOEZY NA POZIOMIE TRANSKRYPCYJNYM

Proces erytropoezy jest kontrolowany przez grupę specyficznych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za aktywację transkrypcji niezbędnych genów. W czasie rozwoju zarodkowego, kiedy mamy do czynienia z erytropoezą fali pierwotnej, głównymi czynnikami transkrypcyjnymi biorącymi udział w procesie powstawania czerwonych krwinek są: GATA1 oraz KLF1 [8,13]. Podczas erytropoezy fali definitywnej aktywacja i represja genów pozostaje pod kontrolą takich czynników transkrypcyjnych jak: GATA1 [14], FOG-1, NFE2 [15], c-myb, Bcl11A, Sox6 [16], Lyl-1 [17] oraz KLF1, a także kompleksu TAL1-LMO2-LBD1-E2A [18,19].

Czynniki transkrypcyjne z rodziny GATA (ang. *GATA-binding factors*) zaangażowane w proces hematopoezy to GATA-1 oraz GATA-2. W początkowych etapach hematopoezy czynnik GATA-2 jest eksprymowany na wysokim poziomie w hematopoetycznych komórkach macierzystych. Jednak kiedy ma dojść do zainicjowania procesu erytropoezy, ulega on represji i zostaje zastąpiony przez czynnik GATA-1 (Ryc. 1). To dynamiczne przejście pomiędzy GATA-2 i GATA-1, nazywamy „przełączaniem czynników GATA" (ang. *GATA „switch"*) [20]. GATA-1, rozpoznając i wiążąc konsensusowy motyw DNA: 5′ A/T GATA A/G 3′, może działać zarówno jako aktywator, jak i represor transkrypcji [21]. Większość pełnionych przez GATA-1 funkcji zależy od jego oddziaływania z białkiem FOG-1 (ang. *Friend of GATA-1*) [22]. Mutacje w genie *Gata-1* zaburzające to oddziaływanie prowadzą do powstawania ciężkich anemii dyserytropoetycznych u ludzi oraz do śmiertelności zarodków mysich w wyniku anemii [23]. Co więcej, GATA1 oddziałuje z czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak TAL1/SCL (w kompleksie z Ldb1, LMO2 oraz E2A), KLF1, Pu.1 czy Sp1, wpływając na aktywację lub represję genów pozostających pod ich kontrolą w sposób pośredni [24].

Białko TAL1/SCL należące do rodziny czynników transkrypcyjnych zawierających podstawowy motyw helisa-pętla-helisa, działa jako aktywator lub represor transkrypcji

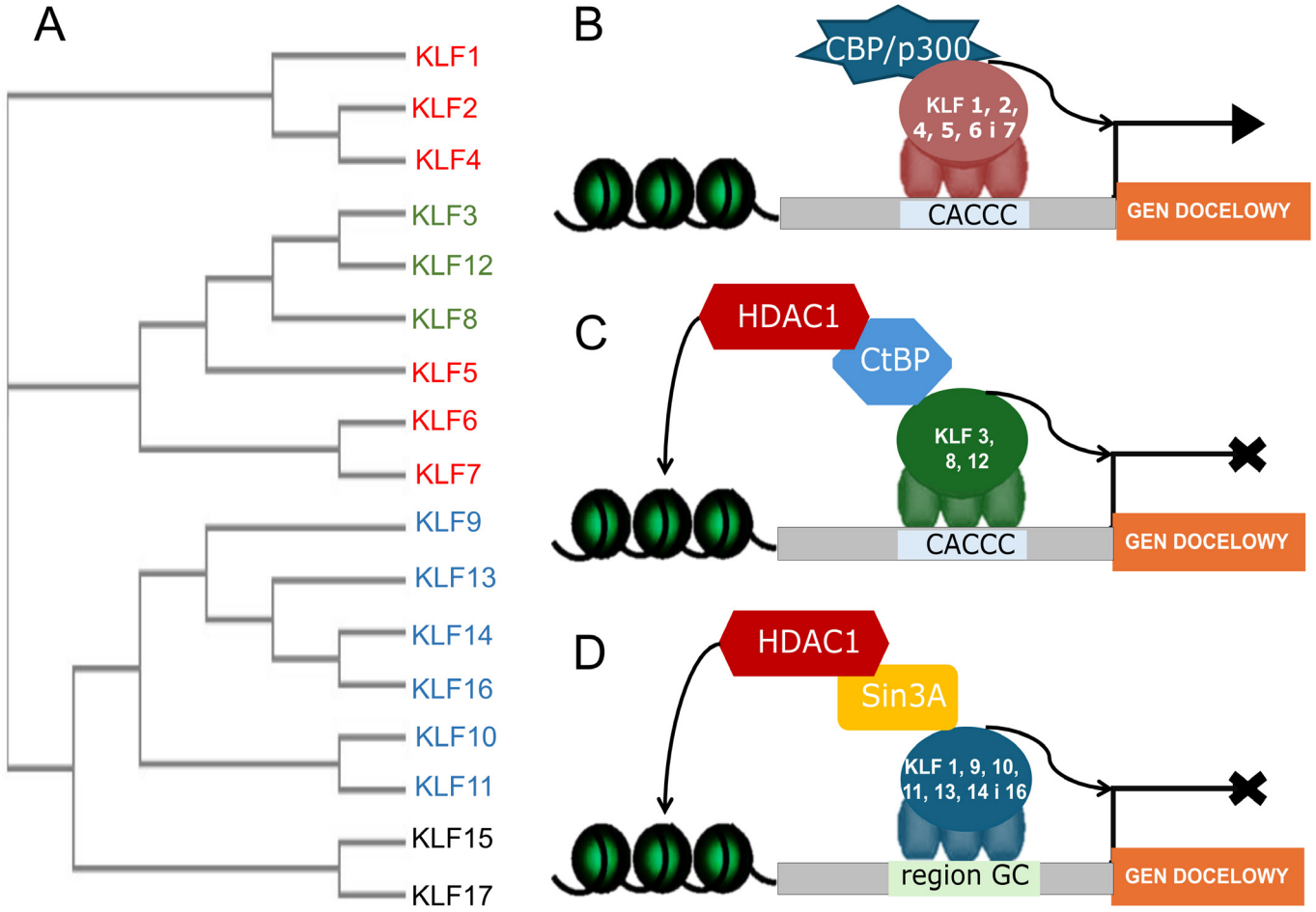
genów podczas dojrzewania czerwonych krwinek. Tworzy ono pentameryczny kompleks z białkami: LDB1, LMO2, białka-E (E2E, HEB, E2-2) oraz GATA1, poprzez który kontroluje etapy dojrzewania komórek erytroidalnych [25]. Myszy pozbawione genów kodujących białka TAL1/SCL, GATA-1 oraz LMO2 wykazują anemię i umierają w wyniku nieefektywnej erytropoezy [24].

Podobnie jak TAL1/SCL, LYL-1 jest czynnikiem transkrypcyjnym, zawierającym podstawowy motyw helisa-pętla-helisa, biorącym udział w regulacji genów erytroidalnych. Najnowsze badania prowadzone na myszach wykazały, że ma on wspólne geny docelowe z białkiem TAL1/SCL, przez co może kompensować jego utratę oraz że pełni ono kluczową rolę w fali pierwotnej erytropoezy [26].

Obok GATA-1 najważniejszym czynnikiem transkrypcyjnym w trakcie erytropoezy jest KLF1 (ang. *Krüppel like-Factor1)*, dawniej nazywany EKLF (ang. *Erythroid Krüppel like-Factor*). Pełni on dwojaką rolę w procesie hematopoezy: na etapie bipotencjalnej komórki progenitorowej megakariocytów i erytrocytów MEP (ang. *megakaryocyte /erythrocyte progenitor*) jednocześnie promuje linię erytroidalną do produkcji erytrocytów oraz hamuje linię megakarioidalną [27].

RODZINA CZYNNIKÓW KRÜPPEL LIKE-FACTOR

Rodzina czynników transkrypcyjnych KLF składa się z białek zaangażowanych w regulację wielu procesów zachodzących w komórkach. Cechą charakterystyczną wszystkich czynników z tej rodziny jest posiadanie trzech wysoce konserwatywnych palców cynkowych o motywie Cys2/His2 gdzie atom cynku jest koordynowany przez dwie histydyny i dwie cysteiny. Każdy z palców cynkowych jest zbudowany z dwóch antyrównoległych, krótkich β-kartek i jednej α-helisy. Drugą cechą charakterystyczną palców cynkowych białek z rodziny KLF są wysoce konserwatywne, siedmioaminokwasowe sekwencje linkerowe łączące je ze sobą (TGEKP(Y/F)X,), nazywane linkerami typu H/C [28]. Palce cynkowe białek z rodziny KLF znajdują się na końcach karboksylowych i są zaangażowane w rozpoznawanie i wiązanie DNA. Rozpoznają motywy GC-bogate oraz zawierające tzw. CACCC-box [29]. Domena palców cynkowych może być również zaangażowana w oddziaływania białko-białko zmieniające jej specyficzność [30,31]. Na końcu aminowym białek z rodziny KLF znajduje się domena odpowiedzialna za aktywację lub represję transkrypcji. Region ten jest dużo bardziej zróżnicowany pomiędzy poszczególnymi białkami w obrębie rodziny KLF, niż domena palców cynkowych.



Rycina 2. Klasyfikacja filogenetyczna i funkcjonalna czynników z rodziny KLF. Analiza filogenetyczna oparta o sekwencje białkowe, członków rodziny KLF, zdeponowanych w NCBI. Drzewo filogenetyczne wykonano w programie ClustalW2. Schemat aktywacji genów docelowych poprzez oddziaływanie z motywem CACCC, a następnie z białkiem CBP/p300. Schemat represji genów docelowych poprzez oddziaływanie z regionem CACCC, a następnie z białkiem CtBP i HDAC1. Schemat represji genów docelowych poprzez oddziaływanie z regionem GC, białkami Sin3 i HDAC1.

Filogenetyczna analiza ludzkich genów kodujących białka z rodziny KLF pozwala na klasyfikowanie tych czynników w trzy grupy, cechujące się różnicami funkcjonalnymi kodowanych białek (Ryc. 2). Grupa 1 zaznaczona na Rycinie 2 kolorem zielonym, to czynniki hamujące transkrypcję genów poprzez ich oddziaływanie z białkiem CtBP (KLF3, 8 i 12, Ryc. 2C), grupa 2 zaznaczona kolorem czerwonym to aktywatory transkrypcji, głównie działające poprzez oddziaływanie z CBP/p300 (KLF 1, 2, 4, 5, 6 i 7, Ryc. 2B), grupa 3, zaznaczona kolorem niebieskim, to białka (KLF 1, 9, 10, 11, 13, 14 i 16) wykazujące aktywność represorową poprzez oddziaływanie z czynnikiem transkrypcyjnym Sin3A. Białka KLF15 i 17 nie klasyfikują się do żadnej z powyższych grup [32].

KLF1 – jest czynnikiem transkrypcyjnym, który odpowiada za aktywację genów podczas dojrzewania erytrocytów. Jednak nie tylko KLF1 ulega ekspresji w komórkach linii erytroidalnej, ale także inne czynniki z tej rodziny biorą udział w regulacji genów, zarówno podczas erytropoezy fali pierwotnej (KLF2 oraz KLF4,[33]), jak i fali definitywnej (KLF3, KLF8, KLF10, KLF12, [34,35]).

KRÜPPEL LIKE-FACTOR 1

KLF1 został zidentyfikowany podczas badań nad regulacją genów globinowych u myszy z erytroleukemią w 1993, a u ludzi w 1996 roku [36,37]. Jego rola to regulacja ekspresji genów na wszystkich etapach dojrzewania erytrocytów w trakcje erytropoezy fali definitywnej. Myszy pozbawione obu alleli genu *KLF1* (*KLF1*$^{-/-}$) cierpią na ciężką anemię pojawiającą się podczas przejścia erytropoezy fali pierwotnej w definitywną, w związku z nieprawidłowym dojrzewaniem erytrocytów, i zamierają w dniu embrionalnym 14.5 [38–40]. W 2015 roku opisano pierwszy, i jak do tej pory jedyny, przypadek żyjącego człowieka bez obu alleli genu *KLF1*, jednak z rozwiniętą ciężką anemią hemolityczną bez sferocytozy, z obecnością erytroblastów w krwi obwodowej i żółtaczką [41]. Umieranie zarodków myszy i bardzo ciężki fenotyp u człowieka pojawiający się w przypadku braku genu *KLF1* pokazuje, jak ważne funkcje pełni ten czynnik transkrypcyjny.

STRUKTURA I BUDOWA DOMENOWA BIAŁKA KLF1

Mysi gen *KLF1* koduje białko o długości 357 aminokwasów, w obrębie którego znajdują się dwa potencjalne miejsca startu translacji. Dowiedziono, że druga metionina w pozycji 19 otwiera ramkę odczytu tego białka w warunkach *in vivo*. Ludzkie białko KLF1 składa się z 362 aminokwasów i jest w 93% podobne do mysiego w obrębie domeny na C-końcu (palce cynkowe) i 69% w obrębie całego białka. Czynnik KLF1 ma budowę domenową i zawiera: na końcu aminowym (u ludzi od 1 do 271 aminokwasów) domenę transaktywacyjną, a na końcu karboksylowym (u ludzi od 272 do 362 aminokwasów) domenę wiążącą DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*) zbudowaną z trzech palców cynkowych o typie C2H2 (ZnF, ang. *zinc fingers*) [37,42] (Ryc. 3).

Domena transaktywacyjna składa się z dwóch subdomen minimalnej aktywacji transkrypcji: TAD1 i TAD2 (Ryc. 3). Domena transaktywacyjna KLF1 jest podobna do TAD występujących w innych aktywatorach transkrypcji, jak np.: p53 (białko supresorowe nowotworów), czy białka wirusa opryszczki VP16 [43].

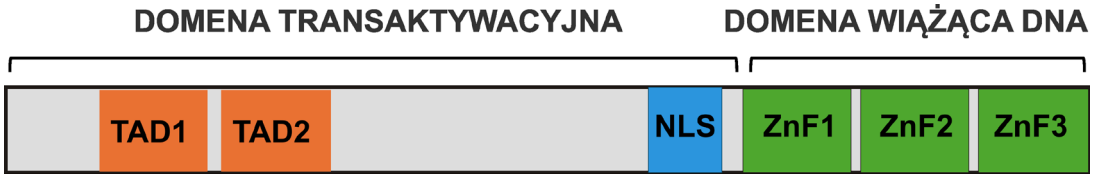
Pierwsze 40 reszt aminokwasowych (subdomena TAD1) rekrutuje kofaktory białkowe, a aminokwasy od 50 do 90 (subdomena TAD2) są niezbędne do aktywacji genu *β-globiny*. Obie domeny TAD zawierają w większości aminokwasy o charakterze kwasowym oraz region PEST bogaty w proliny, kwas glutaminowy, seryny oraz treoniny. Delecja domen TAD powoduje, że KLF1 nie jest wydajnie degradowany w szlaku ubikwityna-proteasom [44]. Udowodniono, że to subdomena TAD1 poprzez wiązania niekowalencyjne oddziałuje z ubikwityną, kierując KLF1 na drogę degradacji [45]. Domena transaktywacyjna pełni zatem dwie funkcje: aktywacji transkrypcji i kierowania na drogę degradacji, które są niezbędne dla KLF1 w trakcie kontrolowania procesu powstawania i dojrzewania erytrocytów.

Cechą charakterystyczną wszystkich białek z rodziny KLF jest obecność domeny wiążącej DNA zbudowanej z trzech palców cynkowych (Ryc. 3). Każdy palec cynkowy w KLF1 rozpoznaje tripletową sekwencję nukleotydową, a zatem wszystkie palce razem oddziałują z motywem o długości 9 nt.

ROLA BIAŁKA KLF1 PODCZAS ERYTROPOEZY

Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono wiele eksperymentów pokazujących porównanie profili ekspresji genów w komórkach z WT-KLF1 oraz pozbawionych genu *KLF1*$^{(-/-)}$. Dowiedziono, że KLF1 odgrywa kluczową rolę zarówno podczas fali pierwotnej, jak i definitywnej erytropoezy [46,47]. Zaś analizy z wykorzystaniem CHIP-seq pokazują jego rolę w regulacji transkrypcji genów związanych z większością procesów, końcowego dojrzewania czerwonych krwinek, od utrzymywania prawidłowego kształtu erytrocytów, przez powstawanie hemoglobiny, aż po regulację cyklu komórkowego [48,49]. KLF1 aktywuje aż 650 genów podczas erytropoezy.

Udowodniono, że KLF1 może pełnić swoją rolę jako represor transkrypcji oddziałując z białkiem Sin3A oraz deacetylazą histonów 1 (HDAC1, ang. *histone deacetylase 1*), a także ulegając sumoilacji [50–52]. Jednak znacznie częściej jego funkcja sprowadza się do aktywacji genów. Aktywność białka KLF1 jest regulowana potranslacyjnie co wspomaga jego oddziaływanie z innymi białkami, np. acetylotransferazą histonów p300 czy białkiem CBP (CBP, ang. *CREB-binding protein*). Ułatwia to oddziaływanie z kompleksem remodelującym chromatynę SWI/SNF poprzez podjednostkę Brg1 (Ryc. 2B) [53–55]. Dzięki oddziaływaniu z kompleksem remodelującym chromatynę oraz kofaktorami transkrypcji KLF1 aktywuje geny docelowe. Powyższe zależności pomiędzy KLF1, a innymi białkami, czy całymi kompleksami białek pozwalają mu na pełnienie roli aktywatora transkrypcji genów: zaangażowanych w budowę łańcuchów globinowych, kontrolujących cykl komórkowy, związanych z metabolizmem hemu, transportem i akumulacją żelaza, budową błony erytrocytów w tym antygenami



Rycina 3. Schemat budowy domenowej czynnika transkrypcyjnego KLF1. Czynnik KLF1 jest zbudowany z dwóch domen: transaktywacyjnej zawierającej dwie subdomeny TAD (ang. *transcription activating domain*, oznaczone kolorem pomarańczowym) i sygnał lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization signal*, oznaczony na niebiesko) oraz domeny wiążącej DNA zbudowanej z trzech palców cynkowych (na zielono).

powierzchniowymi, a także genów kodujących czynniki transkrypcyjne (np. KLF3) [46,56].

KLF1 JAKO CZYNNIK KONTROLUJĄCY CYKL KOMÓRKOWY

W trakcie powstawania czerwonych krwinek jednym z kluczowych procesów jest regulacja cyklu komórkowego, zapewniająca balans pomiędzy proliferacją, a różnicowaniem komórek. KLF1 jest odpowiedzialny za regulację cyklu komórkowego działając jako aktywator transkrypcji, takich genów jak: inhibitory kinaz zależnych od cyklin umożliwiające wyjście komórek z cyklu komórkowego oraz regulatory transkrypcji z rodziny E2F i cykliny wymagane do wejścia komórek w fazę S i syntezę DNA [57]. W komórkach MEL z wymuszoną nadekspresją KLF1 zaobserwowano zwiększoną ekspresję inhibitora p21 (kodowanego przez gen *CDKN1A*, ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) oraz zatrzymanie komórek w fazie G0/G1 [58]. W komórkach pozbawionych *KLF1* dochodzi do znacznego obniżenia ekspresji genu kodującego białko p18 (gen *CDKN2c*), będącego inhibitorem cyklin zależnych od kinaz aktywnych w czasie trwania fazy G1 [59], co wskazuje na rolę KLF1 w hamowaniu podziałów komórkowych. Także inny inhibitor cyklu komórkowego, białko p27 (kodowany przez gen *CDKN1B*), okazał się wrażliwy na brak KLF1 [60]. Odkryto, że sekwencje regulatorowe genów kodujących białka p18 i p21 posiadają odpowiednio trzy i dwa miejsca wiązania dla KLF1 [58,59]. Osobną rolę KLF1 pełni podczas końcowego różnicowania erytrocytów, aktywując geny *E2F2* oraz *E2F4* będące częścią kompleksu Rb-E2F odpowiedzialnego za regulację wejścia komórek w fazę S cyklu komórkowego. W komórkach pozbawionych *KLF1* obserwowano znaczne obniżenie ekspresji E2F2 [61], zaś analizy CHIP-seq wskazały, że KLF1 wiąże się do miejsc regulatorowych w genach *E2F2* i *E2F4* zarówno w promotorach jak i regionach intronowych o właściwościach wzmacniaczy transkrypcji [48,61,62]. Zatem KLF1 pełni dwojaką rolę w trakcie różnicowania: na wczesnych etapach wspiera on proliferację poprzez wejście komórek w fazę S cyklu komórkowego (pozytywna regulacja poprzez geny z rodziny E2F), na późniejszych etapach hamuje podziały komórkowe poprzez aktywację transkrypcji genów kodujących inhibitory: p18, p21 i p27. Aktywowanie powyższych genów przez KLF1 wpływa na końcowy etap dojrzewania erytrocytów, jakim jest pozbycie się jądra komórkowego [57].

ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO KLF1 W HEMOGLOBINIZACJI CZERWONYCH KRWINEK

Czerwone krwinki wiążą tlen i dwutlenek węgla, a w pełnieniu tej roli pośredniczy hemoglobina, czyli metaloproteina złożona z dwóch łańcuchów α- i dwóch β-globiny oraz czterech grup hemu koordynujących atom żelaza. KLF1 kontroluje ekspresję łańcuchów β-globiny. Ludzki locus genu *β-globiny* znajduje się na chromosomie 11 i jest zbudowane z pięciu genów, ulegających kolejno ekspresji w trakcie rozwoju osobniczego [63]. Na wczesnych etapach rozwoju zarodka gen *ε-globiny* ulega wysokiej ekspresji (powstaje hemoglobina zarodkowa), zaś w momencie wykształcenia płodu - wyciszeniu. Na tym etapie aktywacji ulegają geny γ^G*-globiny* i γ^A*-globiny* (co skutkuje produkcją hemoglobiny płodowej). Hemoglobina płodowa jest wytwarzana aż do urodzenia. Kolejnym etapem jest wyciszenie genów *γ-globiny* i aktywacja genu *β-globiny* oraz w mniejszym stopniu *δ-globiny* [64].

Cechą różnicującą erytropoezę fali pierwotnej od definitywnej jest ekspresja specyficznych wariantów hemoglobiny, kodowanych przez wymienione powyżej geny. KLF1 odgrywa kluczową rolę w regulacji przejścia pomiędzy ekspresją hemoglobiny płodowej i dorosłej, zarówno poprzez bezpośrednią aktywację *β-globiny,* jak i pośrednią represję ekspresji *γ-globiny* w progenitorach erytroidalnych u dorosłych, poprzez aktywację genów *Bcl11a*, *KLF3* i *KLF8* [65,66].

Rola KLF1 w hemoglobinizacji nie ogranicza się tylko do produkcji łańcuchów β-globinowych. KLF1 aktywuje, także gen *AHSP* (ang. *a-hemoglobin stabilizing protein*). Jego produkt – białko opiekuńcze AHSP – hamuje akumulację wolnych łańcuchów α-hemoglobiny, które są toksyczne [67]. KLF1 aktywuje, także ekspresję wielu genów związanych z produkcją hemu i metabolizmem żelaza [46,48,68].

ROLA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO KLF1 W UTRZYMANIU PRAWIDŁOWEGO KSZTAŁTU CZERWONYCH KRWINEK

Podczas badań z wykorzystaniem mysich embrionów pozbawionych genu *KLF1* odkryto, że utrata tego genu skutkuje poważnymi konsekwencjami w obrębie morfologii błony komórek erytroidalnych [46,68]. Ekspresja genu *EPB4.9* kodującego dematynę, białko cytoszkieletu odpowiedzialne

Tabela 1. Wybrane geny bezpośrednio aktywowane przez KLF1 związane z błoną i cytoszkieletem erytrocytów.

Nazwa genu (białka)	Funkcja	Źródło
EPB4.9 (dematyna) EPB4.2 Slc4a1 (band3)	Białka cytoszkieletu	[47,69]
CD44 ICAM-4 Lu/BCAM	Cząsteczki adhezyjne antygeny grup krwi	[41,46]
AQP1	Transportery błonowe	[47]

za integralność i stabilizację błony erytrocytu, w komórkach pozbawionych KLF1 była około 20-krotnie obniżona, w porównaniu z komórkami, w których KLF1 ulegał ekspresji. Także wiele innych elementów cytoszkieletu i błony erytrocytów, takich jak antygeny grup krwi, transportery błonowe, spektryny oraz glikoforyny, pozostaje pod kontrolą KLF1, będąc jego genami docelowymi [46,68,69]. Na podstawie badań z wykorzystaniem ChIP-seq dowiedziono, że KLF1 bezpośrednio aktywuje wiele genów kodujących wymienione białka cytoszkieletu i błony erytrocytów [47]. Niektóre z tych genów wymieniono w tabeli 1.

PODSUMOWANIE

KLF1 jest przede wszystkim charakteryzowany jako aktywator transkrypcyjny, pełniący kluczową rolę w regulacji erytropoezy. Jego aktywność jest modulowana przez potranslacyjne modyfikacje, które promują interakcje białko-białko. Jednym z istotnych mechanizmów regulacyjnych jest acetylacja KLF1, która umożliwia jego oddziaływanie z kompleksem remodelującym chromatynę SWI/SNF. Dzięki temu KLF1 uczestniczy w otwieraniu chromatyny i odgrywa centralną rolę w tworzeniu aktywnego centrum transkrypcyjnego, m. in w locusie genu β-globiny.

KLF1 jest klasyfikowany jako pionierski czynnik transkrypcyjny, potrafi wiązać się z zamkniętą chromatyną, inicjować jej przebudowę oraz ustanawiać programy ekspresji genów charakterystycznych dla erytrocytów. KLF1 działa przed innymi czynnikami transkrypcyjnymi, tworząc kaskadę ekspresji genów niezbędną do rozwoju czerwonych krwinek. KLF1 często rekrutuje koaktywatory (takie jak p300/CBP) i ułatwia wiązanie się innych, niepionierskich regulatorów transkrypcji, co czyni go centralnym elementem determinującym los komórek erytroidalnych wywodzących się z multipotencjalnych prekursorów.

PIŚMIENNICTWO

1. Kautz L, Nemeth E (2014) Molecular liaisons between erythropoiesis and iron metabolism. Blood 124(4):479–82
2. Rieger MA, Schroeder T (2012) Hematopoiesis. Cold Spring Harb Perspect Biol 4(12):a008250–a008250
3. Clements WK, Traver D (2013) Signalling pathways that control vertebrate haematopoietic stem cell specification. Nature Reviews Immunology. 2013.
4. Wong PM, Chung SW, Reicheld SM, Chui DH (1986) Hemoglobin switching during murine embryonic development: evidence for two populations of embryonic erythropoietic progenitor cells. Blood 67(3):716–21
5. Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schütte J, Kaimakis P, et al. (2010) Combinatorial Transcriptional Control In Blood Stem/Progenitor Cells: Genome-wide Analysis of Ten Major Transcriptional Regulators. Cell Stem Cell 7(4):532–44
6. Lux CT, Yoshimoto M, McGrath K, Conway SJ, Palis J, Yoder MC (2008) All primitive and definitive hematopoietic progenitor cells emerging before E10 in the mouse embryo are products of the yolk sac. Blood 111(7):3435–8
7. Tober J, McGrath KE, Palis J (2008) Primitive erythropoiesis and megakaryopoiesis in the yolk sac are independent of c-myb. Blood 111(5):2636–9
8. Palis J, Malik J, Mcgrath KE, Kingsley PD (2010) Primitive erythropoiesis in the mammalian embryo. Int J Dev Biol 54(6–7):1011–8
9. Palis J (2014) Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. Front Physiol 5:3
10. Dzierzak E, Philipsen S (2013) Erythropoiesis: Development and Differentiation. Cold Spring Harb Perspect Med 3(4):a011601–a011601
11. de Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R (2014) Of macrophages and red blood cells; a complex love story. Front Physiol 5
12. Toda S, Segawa K, Nagata S (2014) MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. Blood 123(25):3963–71
13. Shimizu R, Takahashi S, Ohneda K, Engel JD, Yamamoto M (2001) In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. EMBO J 20(18):5250–60
14. Fujiwara T, O'Geen H, Keles S, Blahnik K, Linnemann AK, Kang YA, et al. (2009) Discovering Hematopoietic Mechanisms through Genome-wide Analysis of GATA Factor Chromatin Occupancy. Mol Cell 36(4):667–81
15. Andrews NC (1998) The NF-E2 transcription factor. Int J Biochem Cell Biol 30(4):429–32
16. Xu J, Sankaran VG, Ni M, Menne TF, Puram R V., Kim W, et al. (2010) Transcriptional silencing of -globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. Genes Dev 24(8):783–98
17. Capron C, Lacout C, Lécluse Y, Wagner-Ballon O, Kaushik AL, Cramer-Bordé E, et al. (2011) LYL-1 deficiency induces a stress erythropoiesis. Exp Hematol 39(6):629–42
18. Tsiftsoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J (2009) Erythropoiesis: Model systems, molecular regulators, and developmental programs. IUBMB Life 61(8):800–30
19. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF (2011) From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. Blood 118(24):6258–68
20. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S (2010) GATA Switches as Developmental Drivers. J Biol Chem 285(41):31087–93
21. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, et al. (2004) Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. Blood 104(10):3136–47
22. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, Fujiwara Y, Yu C, Weiss MJ, et al. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. Cell 90(1):109–19
23. Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. Nat Genet 24(3):266–70
24. Cantor AB, Orkin SH (2002) Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. Oncogene 21(21):3368–76
25. Wadman IA (1997) The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. EMBO J 16(11):3145–57
26. Chiu SK, Saw J, Huang Y, Sonderegger SE, Wong NC, Powell DR, et al. (2018) A novel role for Lyl1 in primitive erythropoiesis. Development 145(19):dev162990
27. Frontelo P, Manwani D, Galdass M, Karsunky H, Lohmann F, Gallagher PG, et al. (2007) Novel role for EKLF in megakaryocyte lineage commitment. Blood 110(12):3871–80
28. Iuchi S (2001) Three classes of C2H2 zinc finger proteins. Cell Mol Life Sci 58(4):625–35
29. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R (2003) Sp1- and Krüppel-like transcription factors. Genome Biol 4(2):206
30. 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
31. Yien YY, Bieker JJ (2012) Functional Interactions between Erythroid Kruppel-like Factor (EKLF/KLF1) and Protein Phosphatase PPM1B/PP2Cβ. J Biol Chem 287(19):15193–204
32. McConnell BB, Yang VW (2010) Mammalian Krüppel-Like Factors in Health and Diseases. Physiol Rev 90(4):1337–81

33. Eaton SA, Funnell APW, Sue N, Nicholas H, Pearson RCM, Crossley M (2008) A Network of Krüppel-like Factors (Klfs). J Biol Chem 283(40):26937–47
34. Kalra IS, Alam MM, Choudhary PK, Pace BS (2011) Krüppel-like Factor 4 activates HBG gene expression in primary erythroid cells. Br J Haematol 154(2):248–59
35. Pang CJ, Lemsaddek W, Alhashem YN, Bondzi C, Redmond LC, Ah--Son N, et al. (2012) Kruppel-Like Factor 1 (KLF1), KLF2, and Myc Control a Regulatory Network Essential for Embryonic Erythropoiesis. Mol Cell Biol 32(13):2628–44
36. Miller IJ, 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
37. Bieker JJ (1996) Isolation, Genomic Structure, and Expression of Human Erythroid Krüppel-Like Factor (EKLF). DNA Cell Biol 15(5):347–52
38. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH (1995) Lethal β-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. Nature 375(6529):318–22
39. 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
40. Coghill E (2001) Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) coordinates erythroid cell proliferation and hemoglobinization in cell lines derived from EKLF null mice. Blood 97(6):1861–8
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. Chen X, Bieker JJ (1996) Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) contains a multifunctional transcriptional activation domain important for inter- and intramolecular interactions. EMBO J 15(21):5888–96
43. Mas C, Lussier-Price M, Soni S, Morse T, Arseneault G, Di Lello P, et al. (2011) Structural and functional characterization of an atypical activation domain in erythroid Kruppel-like factor (EKLF). Proc Natl Acad Sci 108(26):10484–9
44. Quadrini KJ, Bieker JJ (2006) EKLF/KLF1 is ubiquitinated in vivo and its stability is regulated by activation domain sequences through the 26S proteasome. FEBS Lett 580(9):2285–93
45. Raiola L, Lussier-Price M, Gagnon D, Lafrance-Vanasse J, Mascle X, Arseneault G, et al. (2013) Structural Characterization of a Noncovalent Complex between Ubiquitin and the Transactivation Domain of the Erythroid-Specific Factor EKLF. Structure 21(11):2014–24
46. Hodge D, Coghill E, Keys J, Maguire T, Hartmann B, McDowall A, et al. (2006) A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis. Blood 107(8):3359–70
47. Tallack MR, Magor GW, Dartigues B, Sun L, Huang S, Fittock JM, et al. (2012) Novel roles for KLF1 in erythropoiesis revealed by mRNA-seq. Genome Res 22(12):2385–98
48. Tallack MR, Whitington 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
49. Pilon AM, Ajay SS, Kumar SA, Steiner LA, Cherukuri PF, Wincovitch S, et al. (2011) Genome-wide ChIP-Seq reveals a dramatic shift in the binding of the transcription factor erythroid Kruppel-like factor during erythrocyte differentiation. Blood 118(17):e139–48
50. Chen X, Bieker JJ (2001) Unanticipated Repression Function Linked to Erythroid Kruppel-Like Factor. Mol Cell Biol 21(9):3118–25
51. Chen X, Bieker JJ (2004) Stage-Specific Repression by the EKLF Transcriptional Activator. Mol Cell Biol 24(23):10416–24
52. Siatecka M, Xue L, Bieker JJ (2007) Sumoylation of EKLF Promotes Transcriptional Repression and Is Involved in Inhibition of Megakaryopoiesis. Mol Cell Biol 27(24):8547–60
53. Armstrong JA, Bieker JJ, Emerson BM (1998) A SWI/SNF–Related Chromatin Remodeling Complex, E-RC1, Is Required for Tissue-Specific Transcriptional Regulation by EKLF In Vitro. Cell 95(1):93–104
54. Zhang W, Bieker JJ (1998) Acetylation and modulation of erythroid Krüppel-like factor (EKLF) activity by interaction with histone acetyltransferases. Proc Natl Acad Sci U S A 95(17):9855–60
55. Zhang W, Kadam S, Emerson BM, Bieker JJ (2001) Site-Specific Acetylation by p300 or CREB Binding Protein Regulates Erythroid Kruppel--Like Factor Transcriptional Activity via Its Interaction with the SWI--SNF Complex. Mol Cell Biol 21(7):2413–22
56. Tallack MR, Perkins AC (2010) KLF1 directly coordinates almost all aspects of terminal erythroid differentiation. IUBMB Life 62(12):886–90
57. Gnanapragasam MN, Bieker JJ (2017) Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. Curr Opin Hematol 24(3):183–90
58. Siatecka M, Lohmann F, Bao S, Bieker JJ (2010) EKLF Directly Activates the p21 WAF1/CIP1 Gene by Proximal Promoter and Novel Intronic Regulatory Regions during Erythroid Differentiation. Mol Cell Biol 30(11):2811–22
59. Tallack MR, Keys JR, Perkins AC (2007) Erythroid Kruppel-like Factor Regulates the G1 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p18INK4c. J Mol Biol 369(2):313–21
60. Gnanapragasam MN, McGrath KE, Catherman S, Xue L, Palis J, Bieker JJ (2016) EKLF/KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation. Blood 128(12):1631–41
61. Tallack MR, Keys JR, Humbert PO, Perkins AC (2009) EKLF/KLF1 Controls Cell Cycle Entry via Direct Regulation of E2f2. J Biol Chem 284(31):20966–74
62. Pilon AM, Arcasoy MO, Dressman HK, Vayda SE, Maksimova YD, Sangerman JI, et al. (2008) Failure of Terminal Erythroid Differentiation in EKLF-Deficient Mice Is Associated with Cell Cycle Perturbation and Reduced Expression of E2F2. Mol Cell Biol 28(24):7394–401
63. Wilber A, Nienhuis AW, Persons DA (2011) Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. Blood 117(15):3945–53
64. Stamatoyannopoulos G (2005) Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. Exp Hematol 33(3):259–71
65. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM (2010) KLF1 regulates BCL11A expression and γ- to β-globin gene switching. Nat Genet 42(9):742–4
66. Tallack MR, Perkins AC (2013) Three fingers on the switch. Curr Opin Hematol 20(3):193–200
67. Pilon AM, Nilson DG, Zhou D, Sangerman J, Townes TM, Bodine DM, et al. (2006) Alterations in Expression and Chromatin Configuration of the Alpha Hemoglobin-Stabilizing Protein Gene in Erythroid Kruppel-Like Factor-Deficient Mice. Mol Cell Biol 26(11):4368–77
68. Drissen R, von Lindern M, Kolbus A, Driegen S, Steinlein P, Beug H, et al. (2005) The Erythroid Phenotype of EKLF-Null Mice: Defects in Hemoglobin Metabolism and Membrane Stability. Mol Cell Biol 25(12):5205–14
69. Nilson DG, Sabatino DE, Bodine DM, Gallagher PG (2006) Major erythrocyte membrane protein genes in EKLF-deficient mice. Exp Hematol 34(6):705–12

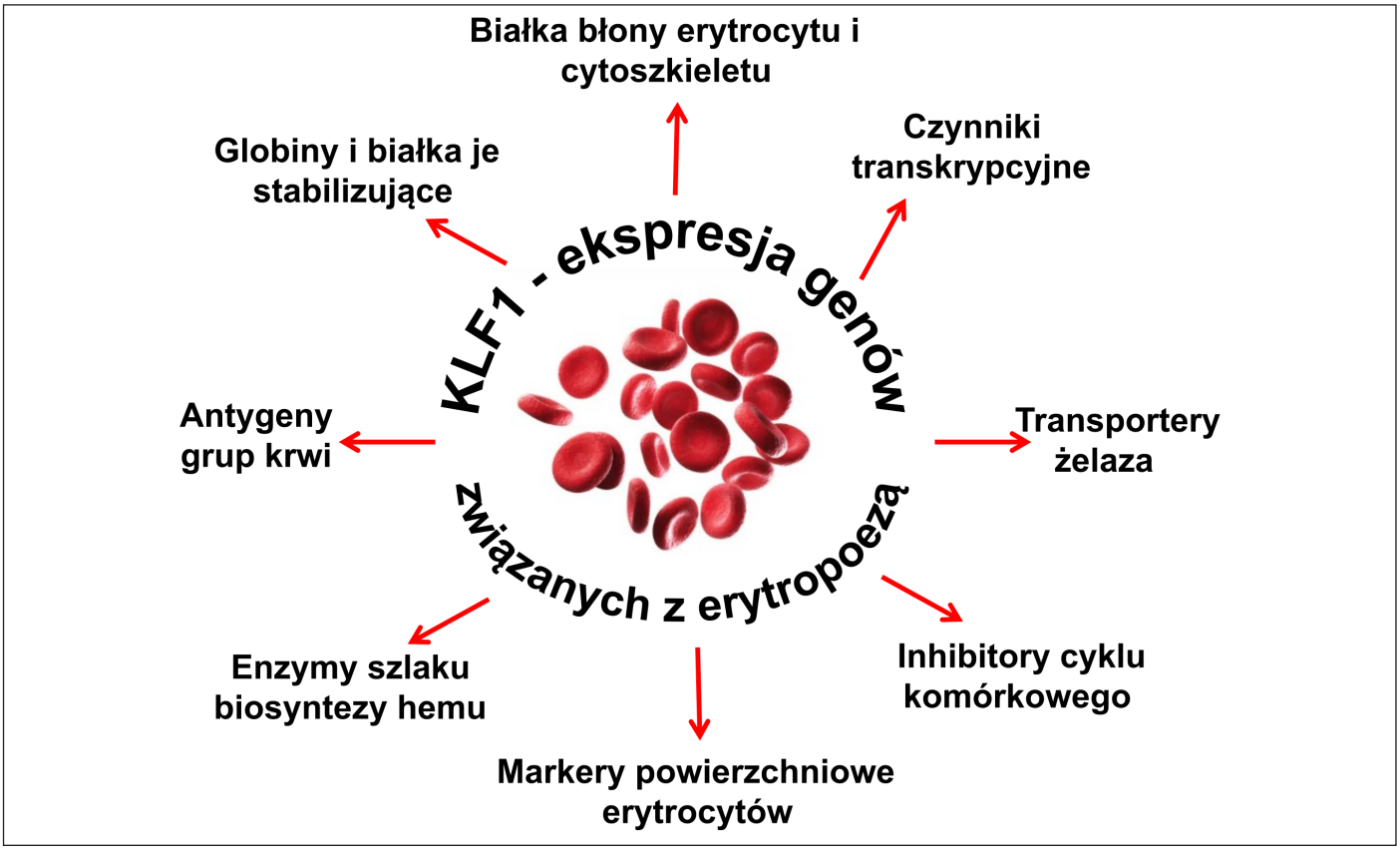
KLF1 (Krüppel-like factor 1) as a key regulator of erythroid gene expression

Klaudia Kulczynska-Figurny[1], Mirosława Siatecka[2]✉

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland
[2]Department of Genetics, Institute of Experimental Biology, Adam Mickiewicz University, Poznań, Poland

✉corresponding author: msiatecka@amu.edu.pl

Keywords: KLF1, erythropoiesis, red blood cells, globins, hematopoiesis

ABSTRACT

KLF1 (Krüppel-like factor 1) is an essential transcription factor involved in almost all stages of erythropoiesis. KLF1 promotes the transition of myeloid progenitor cells towards the erythroid lineage, while inhibiting the megakaryopoietic pathway. Its expression is tissue-specific and limited to hematopoietic organs. It begins in the yolk sac, then in the liver and in bone marrow. KLF1 plays a role as a global regulator of erythrocyte development. It regulates many processes, including globin synthesis, heme, iron acquisition, red blood cell membrane antigens expression. KLF1 is composed of two domains: an N-terminal transactivation domain and a C-terminal DNA-binding domain. KLF1 is the first known transcription factor from the Kruppel-like Factor family, which currently includes 17 members. Their characteristic feature is C2H2 zinc finger motifs interacting with DNA. In addition to erythropoiesis, KLF factors play a key role in regulating gene expression of various biological processes, including cell proliferation, differentiation, and apoptosis.