

CCTC-binding protein (CTCF) dan Perannya dalam Karsinogenesis

Eylin, Kusmardi

Departemen Patologi Anatomi
Fakultas Kedokteran
Universitas Indonesia
Jakarta

ABSTRAK

CCCTC-binding factor atau biasa disingkat dengan CTCF adalah protein yang memiliki banyak fungsi, di antaranya adalah sebagai *insulator* kromatin dan organisasi genom, berpengaruh dalam represi dan aktivasi *promoter* gen, inaktivasi kromosom X, dan pemeliharaan dari urutan genom, dan berkontribusi dalam regulasi transkripsi dan sebagai regulator gen supresor tumor. CTCF juga berperan dalam mengontrol siklus sel. Protein CTCF terdiri dari 3 *domain* yaitu *domain* terminal N, *zinc-fingers*, dan terminal C. CTCF dimodifikasi oleh *SUMOylation* sehingga dapat berperan sebagai represor *promoter* P2 Myc. CTCF berperan sebagai *insulator*, sehingga dapat memelihara konfigurasi kromatin CpG islands pada *promoter* gen yang diperlukan dalam kontrol siklus sel dan mencegah terjadinya *silencing* epigenetik yang menyebabkan terjadinya kanker. CTCF melindungi gen supresor tumor dari metilasi DNA, seperti pada *promoter* BRCA1 dan Rb. CTCF pun berperan pada karsinogenesis kanker paru dengan mengatur RB2/p130 dan pada kanker payudara dengan melindungi miR-125b1 dari metilasi DNA. Dengan demikian CTCF memiliki peran dalam karsinogenesis beberapa jenis keganasan.

Kata kunci: CTCF, tumor supresor gen, karsinogenesis

PENDAHULUAN

Kanker adalah penyebab kematian terbanyak di dunia. Dilaporkan sekitar 7,6 juta kematian akibat kanker pada tahun 2008 (13% dari seluruh kematian). Dari jumlah tersebut, 70% di antaranya terjadi pada negara berpenghasilan rendah hingga sedang. Kematian karena kanker diperkirakan akan terus meningkat, mencapai 13,1 juta kematian pada tahun 2030.¹ Di Amerika Serikat, kanker merupakan penyebab kematian kedua, disebutkan 1 dari 5 penduduk negara tersebut meninggal karena kanker. Diperkirakan ada sekitar 1.437.180 kasus kanker baru dan 565,650 kematian karena kanker pada tahun 2008, mewakili 23% seluruh kematian.²

Proses terjadinya kanker melibatkan peristiwa molekuler yang rumit. Peristiwa molekuler itu antara lain berupa hilangnya kemampuan sel untuk memperbaiki DNA yang rusak sehingga terjadi mutasi pada genom yang mengakibatkan aktivasi onkogen. Hal tersebut menimbulkan pertumbuhan sel tidak terkontrol, inaktivasi dari gen supresor tumor, dan perubahan pada gen pengatur apoptosis. Akhirnya keadaan tersebut menyebabkan pertumbuhan sel yang tidak terkendali dan penurunan kemampuan apoptosis sehingga terbentuk neoplasma.¹

Banyak proses molekular yang terlibat di dalam proses karsinogenesis ini, apalagi setelah berkembangnya teknologi kedokteran molekuler. Saat ini, sudah banyak gen dan protein yang ditemukan, memiliki peran dalam berbagai proses karsinogenesis. Salah satu protein tersebut adalah *CCCTC-binding factor* (CTCF) yang merupakan protein dengan banyak fungsi.

CTCF berperan sebagai protein yang dikaitkan pada *insulator* kromatin dan organisasi genom.³ CTCF juga diketahui berpengaruh dalam represi dan aktivasi *promoter* gen, inaktivasi kromosom X, dan pemeliharaan dari urutan genom.⁴ Dilihat dari berbagai fungsinya, CTCF berkontribusi dalam regulasi transkripsi dan berperan sebagai regulator gen supresor tumor.³ Penulisan ini bertujuan untuk menggambarkan peranan CTCF dalam karsinogenesis.

STRUKTUR DAN FUNGSI CTCF

Gen CTCF terdapat pada kromosom 16q22.1.^{1,5} Gen ini mengkode protein *DNA-binding 11-zinc-finger* yang berikatan dengan lebih dari 20.000 situs pada genom manusia.⁶ Protein CTCF, sebelumnya dikenal sebagai NeP1 adalah protein 11 zinc-fingers yang terdapat pada lalat buah hingga manusia. Protein ini pertama kali diidentifikasi pada ayam sebagai supresor pada onkogen c-myc dan gen lisosom.⁴

A. Struktur CTCF

Protein CTCF terdiri dari 3 *domain* yaitu *domain* terminal N, *zinc-fingers*, dan terminal C (Gambar 1). Terminal C dan N meliputi dua per tiga dari protein tersebut. *Zinc-fingers* dari CTCF memiliki sifat unik sehingga tiap kelompok *zinc-fingers* dapat mengikat DNA yang pas.⁶⁻⁸

Zinc-fingers kira-kira terdiri dari 30 asam amino dan sepasang residu sistein, yang dipisahkan oleh 12 asam amino dari sepasang residu histidin. Asam amino ini terkoordinasi dengan *zinc* untuk membentuk struktur α-heliks yang dapat mengikat DNA.⁷

Regio yang mengapit *domain zinc-fingers* adalah terminal N dan C. Terminal C mengalami fosforilasi oleh casein kinase II. Fosforilasi ini menyebabkan berkurangnya pertumbuhan sel, namun hal ini perlu diteliti lebih lanjut. Terminal N mengalami poli (ADP-ribosil)asi yang penting dalam regulasi fungsi *insulator* CTCF, walaupun masih perlu dikaji lebih lanjut.^{3,6-8}

B. Fungsi CTCF

CTCF memiliki berbagai fungsi seluler yang berbeda, namun yang paling sering dipelajari adalah kemampuan CTCF sebagai faktor transkripsi, protein *insulator* kromatin, dan perannya dalam epigenetik pada kanker. Mutasi gen pada CTCF ditemukan pada pasien dengan tumor payudara, prostat, dan tumor Wilm's. Mutasi ini berlokasi pada regio *zinc finger*, yang

mempengaruhi ikatan dan interaksi dari DNA dengan gen lain.⁷

Untuk dapat meregulasi aktivitas dan lokalisasi dari protein yang berperan dalam proliferasi sel, differensiasi, dan apoptosis, maka CTCF akan dimodifikasi oleh SUMO (*small ubiquitin modifier protein*) dengan penambahan SUMO pada 2 tempat di rantai polipeptidanya. Proses modifikasi ini disebut *SUMOylation*. Modifikasi ini diperlukan CTCF dalam perannya sebagai represor *P2 Myc*.^{8,9}

CTCF berfungsi juga dalam pengontrolan siklus sel.⁷ CTCF terletak pada sentrosom pada metafase dan berinteraksi dengan nukleofosmin/B23. Pada saat itu maka keduanya terdapat pada sentrosom dari metafase hingga fase G1 (Gambar 2). Dengan demikian, interaksi CTCF dan nukleofosmin dapat mencegah sentrosom berduplikasi, sehingga dapat mempertahankan integritas genom.¹⁰

CTCF SEBAGAI REGULATOR PADA REGULASI GEN SUPRESOR TUMOR

Pada sel kanker telah ditemukan bagian dari genom yang DNAnya termetilasi.¹¹ Metilasi DNA dipahami sebagai masuknya gugus metil pada posisi C-5 dari sitosin yang terjadi pada CpG membentuk 5-metilsitosin.^{11,12} CpG adalah bagian dari DNA dimana sitosin bersebelahan dengan guanin pada sekuens basa linear, yang dipisahkan oleh 1 fosfat (-C —fosfat—G).¹³ Bagian tersebut berkaitan dengan komponen regulator dari gen yang didefinisikan sebagai CpG *islands* (bagian dimana terdapat peningkatan densitas CpG).³ Pada kondisi patologis, CpG *islands* termetilasi sehingga terjadi *silencing* epigenetik dari fungsi *promoter* CpG tersebut, yang mengakibatkan transkripsi gen tidak berjalan^{3,11} sehingga dengan demikian *silencing* epigenetik dari gen supresor tumor dianggap sebagai salah satu proses yang menyebabkan keganasan.

CpG *islands* membutuhkan *insulator* kromatin untuk tetap dalam kondisi optimal. Hilangnya *insulator* merupakan faktor yang dapat menyebabkan terjadinya *silencing* epigenetik dari *promoter* gen yang menyebabkan terjadinya kanker. CTCF memiliki mekanisme *insulator*, sehingga dapat memelihara konfigurasi kromatin dari CpG *islands* pada *promoter* gen yang penting untuk kontrol siklus sel.³

Pada beberapa kasus tumor payudara dan prostat dilaporkan terjadi delesi pada regio kromosom 16q22.1 yang merupakan lokus dari

tempat CTCF, gen tersebut terlibat dalam pengontrolan siklus sel. CTCF melindungi gen supresor tumor dari metilasi DNA, seperti pada *promoter* BRCA1 dan Rb (Gambar 3). Gen supresor tumor BRCA1 termetilasi secara abnormal pada 15%-20% kasus kanker payudara sporadis. Interaksi CTCF-DNA mudah mengalami metilasi dan hilangnya CTCF dari *promoter* gen Rb berkaitan dengan masuknya *methyl-CpG-binding protein*, yang menginduksi silencing epigenetik.¹¹

Komunikasi antara *enhancer* dan *promoter* diblok oleh CTCF yang terikat pada DNA antara *enhancer* dan *promoter* tersebut. Pemblokiran *enhancer* tersebut terjadi selama DNA tersebut tidak mengalami metilasi. Metilasi pada tempat tersebut akan menghambat ikatan DNA dan CTCF sehingga *enhancer* bisa memberikan sinyal kepada *promoter*. Selanjutnya *promoter* dapat menginisiasi terjadinya transkripsi (Gambar 4).¹¹

CTCF PADA BEBERAPA KEGANASAN

Protein Rb2/p130 memiliki aktivitas tumor supresor pada kanker paru. Fiorentino *et al* menemukan mekanisme yang mengontrol ekspresi gen Rb2/p130 pada fibroblas paru. Pada fibroblas paru, ekspresi gen Rb2/p130 secara langsung dikontrol oleh CTCF yang terikat pada *promoter* gen Rb2/p130, yang berperan dalam menginduksi dan memelihara organisasi kromatin spesifik yang aktivitas transkripsi gen. Modifikasi epigenetik dari gen Rb2/p130 berperan pada rusaknya aktivitas Rb2/p130 selama proses neoplastik.¹⁴

Penelitian Fiorentino *et al* menggunakan sel SCLC (jenis H82 dan H69), non-SCLC (A549 dan H358), dan MRC-5 (fibroblas paru normal). Analisis dilakukan dengan menggunakan *western blot*. Hasil menunjukkan ekspresi Rb2/p130 rendah pada SCLC, sementara pada NSCLC mengalami overekspresi mengacu pada fibroblas paru normal MRC-5 (Gambar 5). CTCF secara langsung meregulasi ekspresi gen Rb2/p130 pada fibroblas paru MRC-5. Pada NSCLC dan SCLC, dimana kadar Rb2/p130 berkurang, fungsi CTCF dalam meregulasi ekspresi gen Rb2/p130 juga terganggu.¹⁴

MicroRNA (miRNA) adalah RNA *noncoding* dan terlibat pada berbagai proses seluler. Pada mamalia, miRNA diprediksi mengontrol aktivitas transkripsi lebih dari 60% gen yang mengkode protein. Beberapa miRNA memiliki fungsi onkogenik seperti miR-17-92,

miR-155, dan miR-372-373 dapat mempengaruhi proliferasi sel, miR-34, miR-26a, dan miR-125b sebagai gen supresor tumor.¹⁵

miR-125b1 terletak pada kromosom 11q24.1. miR-125b1 dapat mengalami metilasi DNA pada *promoter CpG islands* pada pasien dengan kanker payudara. Pada sel payudara normal, CTCF terdistribusi sepanjang lokus miR-125b1, sementara pada tumor payudara primer, tidak terdapat CTCF.¹⁵

Soto-Reyes *et al* tahun 2012 melakukan penelitian terhadap profil metilasi DNA dari *CpG islands* miR-125b1 pada sel kanker payudara, menggunakan konversi natrium bisulfite dan MS-PCR. Sebagai kontrol, digunakan sel kanker yang *non-transformed* (MCF10A) dan DNA yang termetilasi oleh enzim (IVD). Data menunjukkan bahwa metilasi DNA pada *CpG island* miR-125b1 terjadi secara primer pada sel kanker yang *transformed* (MDA-MB-231 dan MCF7), kecuali SK-BR-3 (Gambar 6).¹⁵

Rakha *et al* melakukan penelitian terhadap 344 kasus karsinoma payudara invasif, dengan melakukan pewarnaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi CTCF. Untuk memverifikasi spesifitas dari imunoreaktivitas CTCF, *blocking studies* dilakukan (Gambar 7). Jaringan payudara mengekspresikan CTCF pada sel parenkim pada duktus dan lobulus normal. Pola pulasan dari jaringan normal terutama pada inti dan beberapa pada sitoplasma. Sel yang ganas menunjukkan pola pulasan inti dan sitoplasma (Gambar 8).⁵

Hasil penelitian menunjukkan CTCF diekspresikan pada inti sebesar 41% kasus kanker payudara, dan 77% pada sitoplasma. Ditemukan pula bahwa tidak ada korelasi antara ekspresi CTCF dan jenis tumor payudara, sementara korelasi yang signifikan ditemukan antara ekspresi inti dan sitoplasma dengan *grade histologis* tumor. Tumor yang *low-grade* menunjukkan aktivitas proliferasi yang sedikit dan ekspresi inti yang positif, sementara tumor *high-grade* menunjukkan ekspresi yang berkurang atau tidak menunjukkan ekspresi sama sekali.⁵

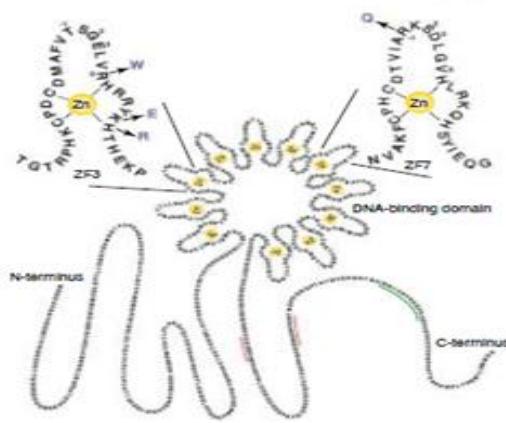
RINGKASAN

Terjadinya kanker melibatkan peristiwa molekul yang rumit. Sejak perkembangan teknologi molekuler, banyak gen dan protein yang ditemukan memiliki peran dalam karsinogenesis, salah satunya adalah CTCF. CTCF terdiri atas 3 *domain*, yaitu terminal N, *zinc-fingers*, dan

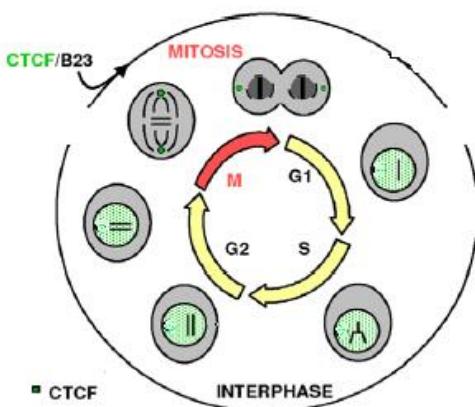
terminal C. CTCF memiliki banyak fungsi, diantaranya adalah regulasi transkripsi, berperan sebagai *regulator* gen supresor tumor, dan sebagai kontrol siklus sel. CTCF memiliki mekanisme *insulator*, sehingga dapat memelihara konfigurasi kromatin dari CpG *islands* pada *promoter* gen yang penting untuk kontrol siklus sel dan mencegah terjadinya *silencing* epigenetik yang menyebabkan terjadinya kanker. CTCF melindungi gen supresor tumor dari metilasi DNA, seperti pada *promoter* BRCA1 dan Rb. CTCF berperan pada karsinogenesis kanker paru dengan mengatur RB2/p130 dan pada kanker payudara dengan melindungi miR-125b1 dari metilasi DNA.

DAFTAR PUSTAKA

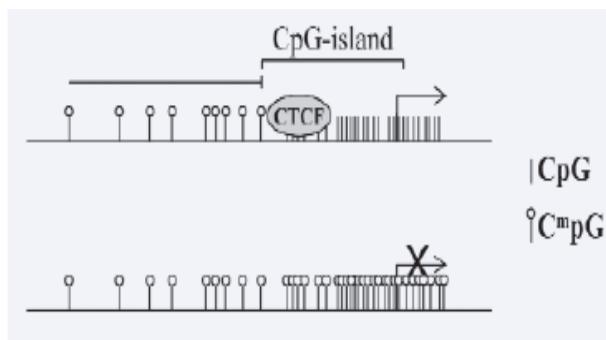
1. World Health Organization. Cancer [homepage on the internet]. 2013 [updated 2013 January; cited 2013 February 15]. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en.
2. Stricker TP, Kumar V. Neoplasia. In: Vinay K, Abbas AK, Fausto N, Aster JC, editors. Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2010. p.260-330.
3. Recillas-Targa F, Rosa-Velazquez IA, Soto-Reyes E. Insulation of tumor suppressor genes by the nuclear factor CTCF. Biochem Cell Biol. 2011;89:479-88.
4. MacPherson MJ, Sadowski PD. The CTCF insulator protein forms an unusual DNA structure. BMC Mol Biol. 2010;11:101.
5. Rakha EA, Spinder SE, Paish CE, Ellis IO. Expression of the transcription factor CTCF in invasive breast cancer: a candidate gene located at 16q22.1. Brit J Cancer. 2004;91:1591-6.
6. Fiorentino FP, Giordano A. The tumor Suppressor role of CTCF. J Cell Physiol. 2012;227:479-92.
7. Talbot A. Potential role of CTCF in differential papillomavirus gene expression. Cited 2013, February 15. Available from: www.wpi.edu/Pubs/E-project/Available?E-project-043009-150809/unrestricted/TalbotMQP.pdf.
8. Zlatanova J, Caiafa P. CTCF and its protein partners: divide and rule? J Cell Sci. 2009;122:1275-84.
9. Gill G. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? Genes Dev. 2004;18:2046-59.
10. Rosa-Garrido M, Ceballos L, Alonso-Lecue P, Abraira C, Delgado MD, Gendarillas A. A Cell Cycle Role for the Epigenetic Factor CTCF-L/BORIS. PLoS ONE. 2012;7:1-6.
11. Recillas-Targa F, Rosa-Velazquez IA, Soto-Reyes E, Benitez-Bribiesca L. Epigenetic boundaries of tumor suppressor genes promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. J Cell Moll Med. 2006;10:554-68.
12. Hamdani C, Ham MF, Siregar NC. Patologi Molekuler. Jakarta: Badan Penerbit FKUI;2012.
13. Jabbari K, Bernardi G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. Gene. 2004;333:143-9.
14. Fiorentino FP, Macaluso M, Miranda F, Montanari M, Russo A, Bagella L, et al. CTCF and BORIS Regulate Rb2/p130 Gene Transcription: A Novel Mechanism and a New Paradigm for Understanding the Biology of Lung Cancer. Mol Cancer Res. 2011;9:225-33.
15. Soto-Reyes E, Gonzalez-Barrios R, Cisneros-Soberanis F, Herrera-Goepfert R, Perez V, Cantu D, et al. Disruption of CTCF at the miR-125b1 locus in Gynecological Cancers. BMC Cancer. 2012;12:40-9.



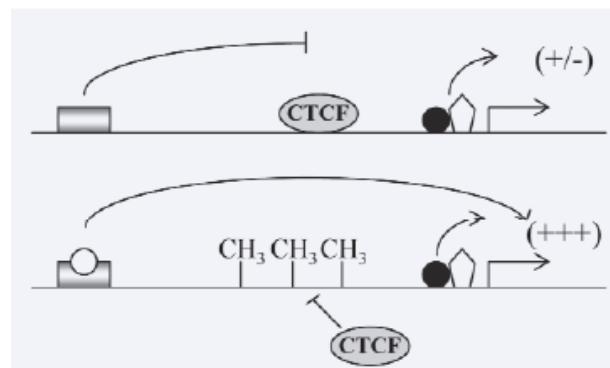
Gambar 1. Struktur dari CTCF dan Zinc-fingersnya⁷



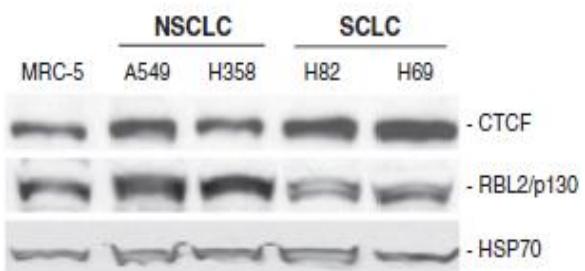
Gambar 2. CTCF saat siklus sel¹⁰



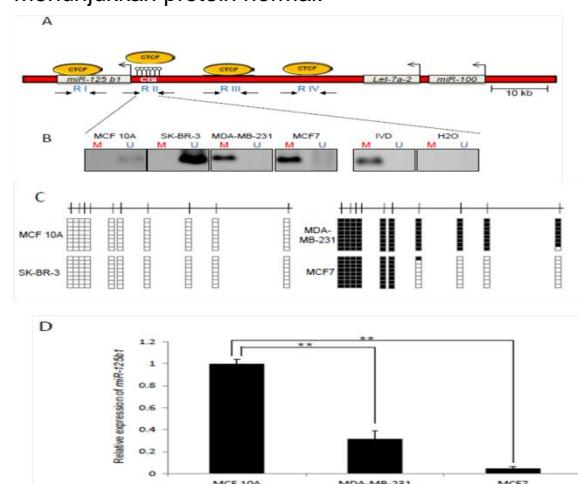
Gambar 3. Perlindungan terhadap DNA metilasi dari CpG islands oleh CTCF. CpG pada CTCF binding site akan mempertahankan pulau CpG pada keadaan tidak termetilasi. C^mpG: CpG termetilasi.¹¹



Gambar 4. Aktivitas CTCF dalam melakukan pemblokiran terhadap enhancer. Enhancer, promoter.¹¹

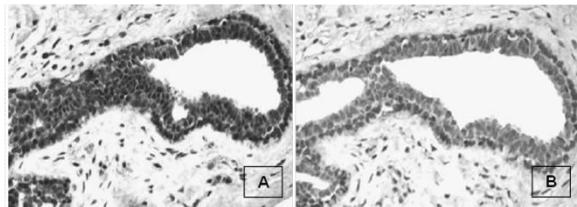


Gambar 5. Ekspresi protein dari CTCF, Rb2/p130 (RBL2/p130) pada nonimmortalized lung fibroblast (MRC-5), pada sel A549 dan H358 (NSCLC), dan pada H82 dan H69 (SCLC). Deteksi dengan Western blotting. Ekspresi dari HSP70 diperiksa untuk menunjukkan protein normal.¹⁴

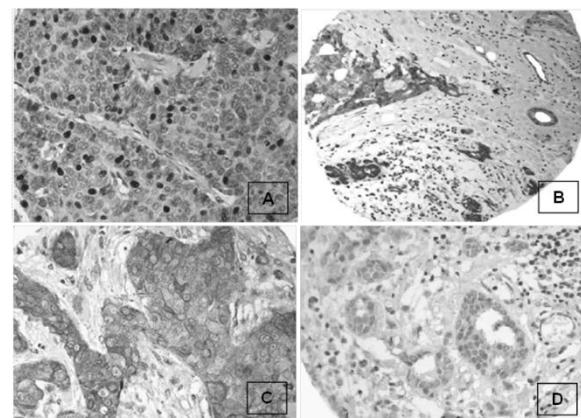


Gambar 6. Korelasi antara metilasi DNA dan ekspresi dari miR-125b1 pada sel kanker payudara. A. Gambaran skematik lokus miR-125b1. B. Pemeriksaan status metilasi DNA menggunakan MS-PCR pada sel kanker payudara. M: termetilasi, U: tidak termetilasi. C. Menggunakan natrium bisulfit untuk menentukan status metilasi. Kotak hitam: CpG islands yang termetilasi, kotak putih: CpG islands yang tidak termetilasi.

Iasi. D. Analisis ekspresi miR-125b1 pada sel kanker payudara dibandingkan dengan MCF 10A. $P <0,001$ Student's *t*-test.¹⁵



Gambar 7. A. Ekspresi CTCF pada sel parenkim dari payudara. B. Kasus yang sama setelah penghambatan peptida dari antibodi menunjukkan pulasan yang berkurang.⁵



Gambar 8. A.Ekspresi CTCF pada jaringan payudara normal dan malignan. B. Karsinoma duktal/NST menunjukkan pulasan CTCF pada inti yang positif dengan pola heterogen. C. Kasus dengan pulasan sitoplasma. D. Kasus dengan pulasan CTCF yang berkurang atau lemah dari CTCF pada sel stroma.⁵