



Schwannomaların Moleküler Biyolojisi

Molecular Biology of Schwannomas

Fatih BAYRAKLI^{1,2}, Ramazan DOĞRUL^{1,2}

¹Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Marmara Üniversitesi, Nörolojik Bilimler Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

ÖZ

Schwannomalar tek başlarına veya nörofibromatozis tip2, schwannomatozis, Carneyin kompleksi gibi bir ailesel tümör sendromunun parçası olarak görülebirlirler. Merlin proteininin fonksiyon kaybı bu tümörlerin patogenezinde en önemli nokta olup, kromozom 22'deki NF2 geninin direkt genetik değişikliğiyle veya ikincil olarak merlinin inaktivasyonu ile olur. Bu tümörlerin biyoloji ile ilgili yapılacak çalışmalar tümörojeneze götüren yolların aydınlatılmasına yardım eder ve tedavi hedeflerinin belirlenmesi için de hayatidir.

Derlemede, okuyucuya bir öngörü sağlamak için schwannoma moleküler biyolojisi ile ilgili literatürü kısaca özetleyeceğiz.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Schwannoma, NF2 geni, Merlin, Moleküler, Biyoloji

ABSTRACT

Schwannomas may occur spontaneously, or as a component of a familial tumor syndrome such as neurofibromatosis type 2 (NF2), schwannomatosis and Carney's complex. Loss of function of merlin is the most important crossroad to the pathogenesis of these tumors, either by direct genetic change involving the NF2 gene on chromosome 22 or secondarily to merlin inactivation. Studying on the biology of these tumors helps to illuminate the genetic pathways leading to tumorigenesis and is crucial in identifying therapeutic targets.

In this review, we will shortly summarize the literature related with schwannoma molecular biology to provide an insight to the reader.

KEYWORDS: Schwannoma, NF2 gene, Merlin, Molecular, Biology

■ GİRİŞ

Schwannomalar sporadik olarak ortaya çıkabileceği gibi, nörofibromatozis (NF) gibi bir sendromun parçası olarak da klinikte karşımıza çıkabilir. İsimleri ve patolojik tanıları aynı olmasına rağmen bu tümörlerin klinik davranışlarının ve radyolojilerinin benzer olmadığı bilinmekte ve bu durum bu tümör grubunun alt tiplerinin olduğu fikrini vermektedir. Schwannomaların bir kısmı yıllık takiplerde büyümemesine rağmen, bir kısmı da belirgin büyüme göstermektedir. Bu tümörlerin oluşumunu sağlayan ve bu klinik davranış ve radyolojik farklılığın arkasında yatan biyolojik mekanizmalar

günümüzde tam olarak ortaya konulamamasına rağmen, bu konuda ciddi güncel çalışmalar yürütülmektedir. Bu derlemedeki amacımız bugüne kadar ortaya konabilmiş schwannoma biyolojisi ile ilgili bilgilerin bir özeti sunmaktır.

NF2 Geni/Merlin Proteini

Bu gen kromozom 22q12.2'de yerleşmiş olup, 17 ekzonu, izoformları vardır ve merlin olarak adlandırılan tümör baskılayıcı proteini kodlar (6). Merlin proteini embriyolojik gelişim esnasında yüksek seviyelerde üretilir. Erişkinlerde, belirgin üretim schwann hücrelerinde, meningeal hücrelerde, lenslerde



Yazışma adresi: Fatih BAYRAKLI

E-posta: fatih.bayrakli@marmara.edu.tr

ve sınırlarda gösterilmiştir. Bu protein amino terminal FERM bölgesi, sonrasında koil-koil kısmı ve sonunda da hidrofilik kuyruktan oluşur (Şekil 1) (6, 17). Merlin proteini ezrin, radixin, moesin (ERM) protein ailesinin üyelerinin bazıları ile benzerlik göstermekte olup, hücre zarındaki proteinler ile sitoskeletal bileşenleri bağladığı düşünülmektedir. Merlin proteininin FERM bölgesi ERM proteinlerinden farklı olarak, evrimsel olarak korunmuş mavi kutu motifini ve 17 amino asit uzunluğundaki N-terminal kısmı barındırır. ERM proteinleri Rho aktivasyonu ve takip eden bazı kimyasal reaksiyon ile kapalı konumlarını muhafaza ederler. Açık hale geçtiklerinde FERM bölgeleri CD44 ve ICAM gibi hücre yapışma reseptörlerinin sitoplazmik bölgeleriyle ilişkiye girerler ve C-terminal bölgeleri aktin filamentleri ile bağlantı kurar. Biyokimyasal ve mutasyon çalışmaları Merlin proteininde PAK aracılı Ser 158 fosforilasyonuna cevap olarak aynı yapısal değişimi geçirdiğini göstermektedir. Merlin proteininde Ser 158'in alanine mutasyona olması bu proteinin büyüme baskılayıcı aktivitesini artırır; fakat mutasyon aspartik asit oluşumuna yol açarsa bu aktivite yok olur. Merlinin Mavi kutu mutant şeklinin aşırı yapımının hayvan deneylerinde aşırı proliferasyona yol açtığı gösterilmiştir (6, 17).

Kapalı ve aktif Merlin proteinin seviyesi, büyüme durması durumuna geçen hücrelerde kontakt baskılaması, matris yapışkanlığının kaybedilmesi, büyüme faktörlerinin yersizliği veya bazı faktörlere maruziyetten dolayı artar. Bu durum Merlin proteininin bazı anti-mitojenik sinyallerle birlikteliğini gösterir. Merlin proteinini Ser 158'de fosforilleyen promotojenik sinyaller N terminal FERM bölgesi ile C terminal kuyruk arası bağlantıyı keserek proteini inaktif hale getirirler. Ters olarak kadherinler veya mitojenik sinyallerin yokluğu Merlinin kapalı şeklinin birikmesini sağlar (6, 17).

Son zamanlarda yapılmış çalışmalar, Merlin proteinin dağılımının dinamik olarak değişik sinyallere cevap olarak değişebileceğini ve beklendiğinden daha yaygın olduğunu ve bu proteinin plazma membranında veya çok yakınında fonksiyonel olduğunu göstermiştir. Buna ilave olarak, bu proteinin hücre yüzey proteinleri ve sitoskeletal devinim ve iyon transportunu düzenlemede rol alan proteinlerle de etkileşime girdiği gösterilmiştir (17).

Schwannoma Biyolojisi ile İlişkili Yolaklar

Merlinin hücre çoğalmasını ve tümör oluşumunu baskılamasının bir yolu DNA hasar ve tamiri, hücre siklus kontrolü, apoptoz, oksidatif stres, kromatin yeniden şekillendirme, onkogen regülasyonu ve p53 ve WNT sinyal iletimini de etkileyen CUL4A-RBX1-DDB1-VprBP/DCAF1 E3 ubiquitin-protein ligaz kompleksini baskılamasıdır (Şekil 2). Bu baskılamayı kapalı şeklinin çekirdeğe transloke olması ile sağlar. Buradaki bozulma özellikle CUL4A'nın katıldığı DNA replikasyonu, tamiri ve

kromatik yeniden şekillendirme mekanizmalarını bozarak tümörögeneze yol açar (5, 6, 17).

Merlinin proliferasyonu plazma membranındaki transmembran büyüme faktör reseptörlerinin miktarını azaltarak engellediği bildirilmiştir. Aynı zamanda Merlinin inaktive olmasının normal hücrelerin kontakt inhibisyonundan çıkıp tekrardan hücre siklusuna girmesine yol açtığı gösterilmiştir (6, 17).

Merlin proteininin hücre büyümesini, çoğalmasını, hareketliliğini ve hayatiyetini sürdürmesini sağlayan mTORC1 kinaz kompleksinin negatif düzenleyicisidir (Şekil 3). mTORC1 hücre büyümesi ve metabolizmasının kritik düzenleticilerinden biridir ve protein ve lipid biyosentezini uyarırken otofajiyi baskılar (18).

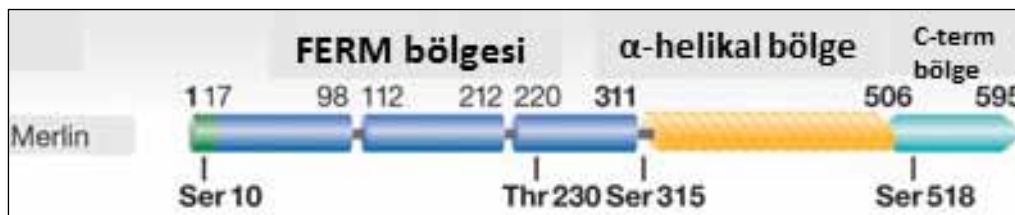
Merlin WWC1 gen proteini (KIBRA olarak da isimlendirilir) ile birlikte sinerjik olarak LATS1 ve LATS2'nin fosforilasyonuna sebep olur ve bu yolla Hippo/SWH (Sav/Wts/Hpo) sinyal yolağının muhtemel düzenleyiciliğinde rol alır (Şekil 4). Bu sinyal yolağı proliferasyonu kısıtlayarak ve apoptozu geliştirerek tümör baskılanmasında önemli rol oynar.

Normal hücreleri kontakt inhibisyonundan kurtarmaya ilave olarak, Merlin proteinin kaybı bu hücrelerin hücre siklusunda G1 fazını geçmelerini de hızlandırır. Bu durum, Merlinin hücre siklus ilerlemesinde bir fren rolü oynadığını düşündürür. Merlinin deri epitelinde yapışma proteinlerinin matürasyonu ve sıkı bağlantı oluşumunda rol oynadığı ve dolayısı ile Merlin kaybının tümörögenез esnasında hücre yapışkanlığı ve polaritesini bozduğu düşünülmektedir. Bu gözlemler Merlinin tümörögenезi epitelyal adhezyonu ve polariyesi destekleyerek ve proliferasyonu engelleyerek dizginlediğini ima etmektedir.

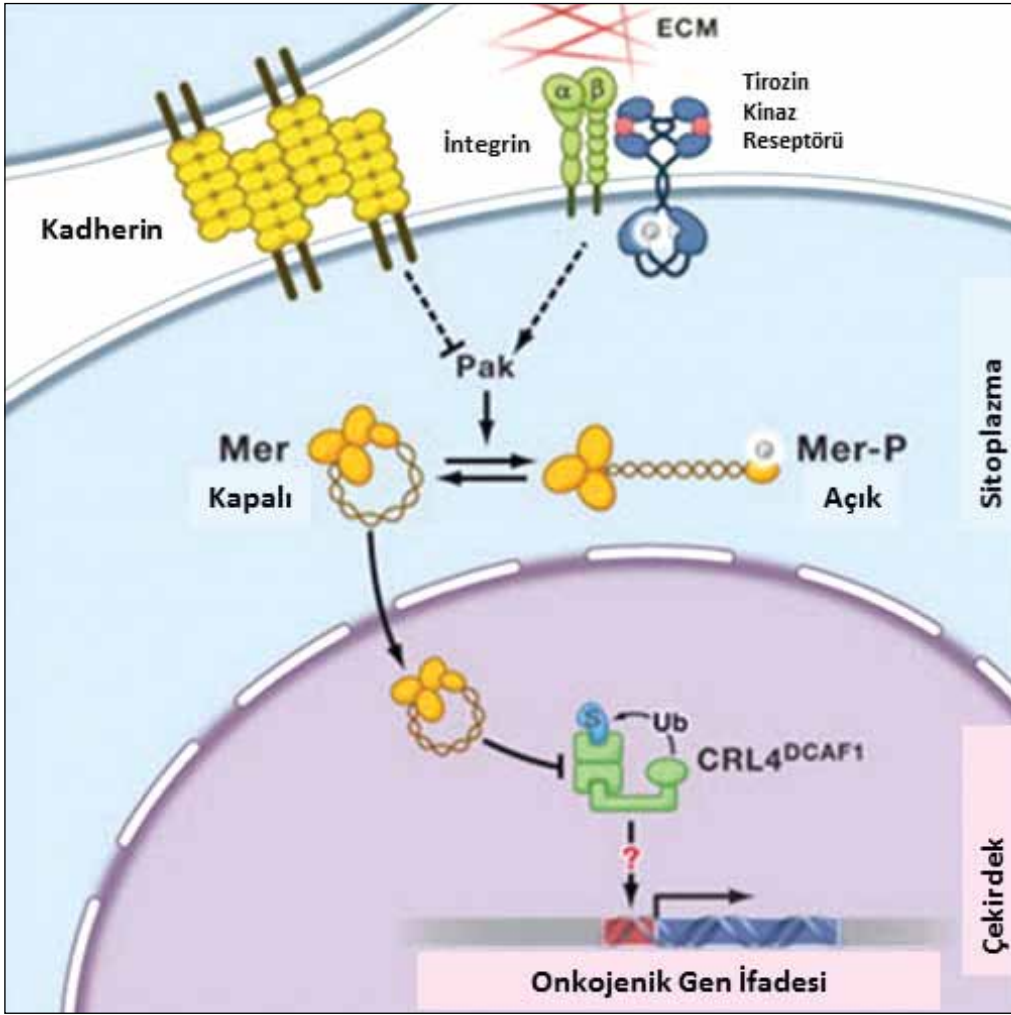
Mutasyon Çalışmaları

Schwannomalarda yapılan genetik çalışmalarda değişmeden görülen genetik değişiklik NF2 geninin inaktivasyonudur. Sporadik schwannomalarda yapılan mutasyon analizlerinde NF2 geninde mutasyon bulunanların oranı %15-84 arasında değişmektedir ve bunların çoğu güdük protein oluşumuna yol açan küçük delesyonlar ve nokta mutasyonlardır. RNA ve protein seviyesinde NF2 gen ürünü üzerinde yapılan çalışmalarda, gen ifadesinde azalma bulunan tümörlerin oranının NF2 gen mutasyonu bulunan olgulardan çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (6, 9, 10, 19). Bu durum mutasyon tarama çalışmalarının NF2 geninin sadece protein kodlayan kısımlarını içermesi, genin çalışmasını düzenleyen bölgeleri içermemesi ile açıklanabileceği gibi, epigenetik mekanizmaların varlığını da düşündürmektedir.

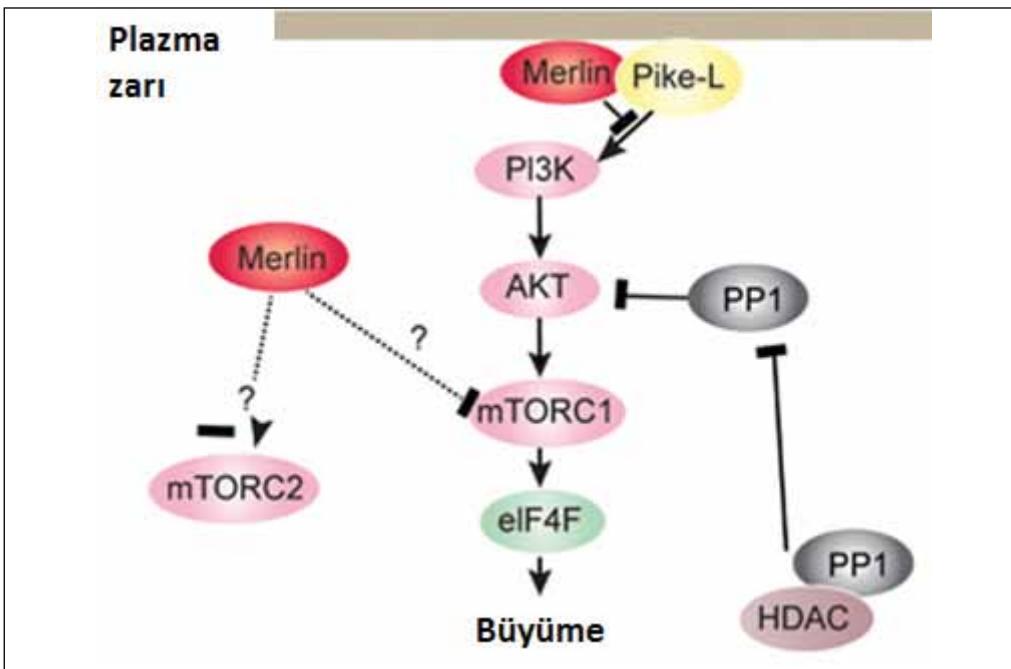
Merlin proteinin fonksiyonel kaybına yol açacak durumlar schwannomaların gelişimi için elzemdir. NF2 geninde oluşacak eşey hücre heterozigot etkisizleştirici mutasyonlar otozomal



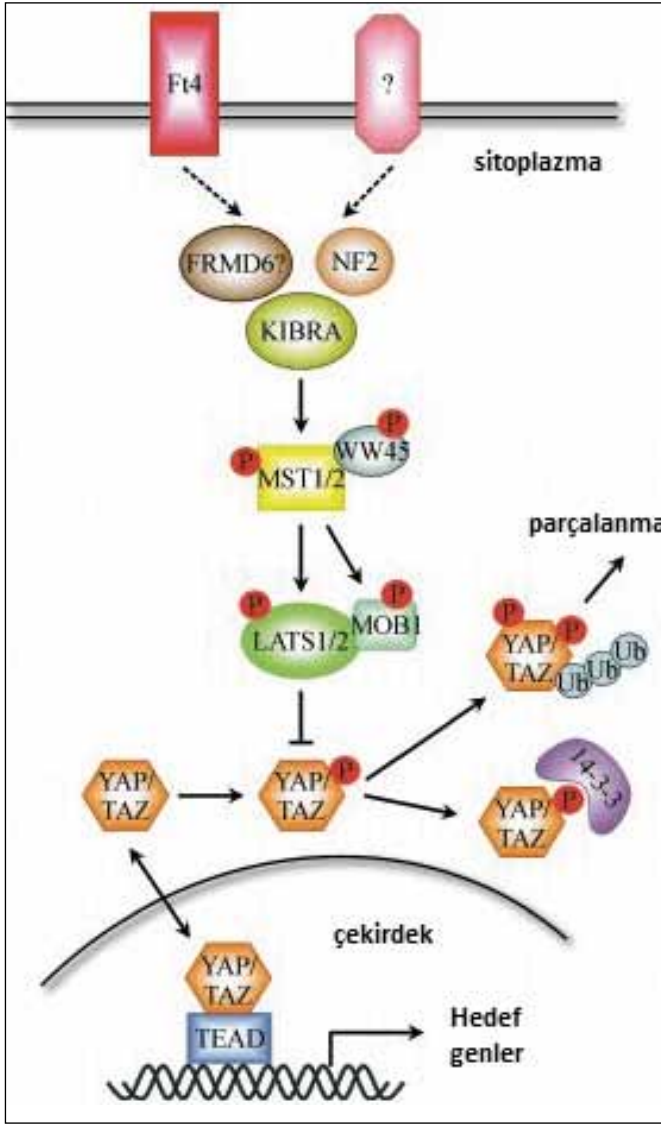
Şekil 1: Merlin proteinin şematik yapısal görünümü.



Şekil 2: Merlin proteinin kapalı hali çekirdekte birikir, E3 ubiquitin ligaza bağlanıp aktivitesini baskılar.



Şekil 3: Merlin mTORC1'in katıldığı sinyal yolağını inhibe etmektedir.



Şekil 4: NF2-KIBRA-LATS1/2 etkileşimi.

dominant kalıtım gösteren NF2 bozukluğuna yol açar. Bu gen(9) in biallelik somatik mutasyonları sporadik schwannomalar da gösterilmiştir. Bu genin bozukluğunda oluşan diğer hastalıklar, vestibüler olmayan birçok schwannomaların (kraniyal, periferik ve otonomik sinirlerden kaynaklanan, iyi huylu) oluşumuyla karakterize olan Schwannomatozis 1 ve Mezetelyomadır.

Schwannomalarda Gen İfade Çalışmaları

Gen ifade çalışmaları moleküler temelde çalışmayı genom (DNA) seviyesinden RNA seviyesine taşır ve dokuda hangi genlerin RNA oluşturup oluşturmadığı veya oluşan miktarı üzerinden mekanizma yorumlanmaya çalışılır. Agnihotri ve ark. (1) schwannomalarda yaptıkları gen ifadesi profillemesi çalışmasında birçok farklı genin kontrollerden farklı olarak ifade edildiğini ve daha önce çalışmalar ile bulunmayan proliferasyon ve antiapoptotik yolların bu süreçlerde ortaya çıktığını gösterdiler. Çalışmalarında schwannomalarda özellikle PI3K/AKT/mTOR yolağının normal dışı aktive olduğunu ortaya

koydular. Bu yolağın schwannoma biyolojisi ile ilişkisi daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (3, 4, 11, 12).

Zhang ve ark. (20) kistik ve solid schwannomalarda yaptıkları mutasyon ve gen ifadesi çalışmasında NF2 geninde ki mutasyonlar açısından iki farklı tip schwannoma arasında fark bulamamalarına rağmen, gen ifade çalışmasında özellikle C1orf130, CNTF, COL4A3 ve COL4A4 gen ifadelerinde farklılık görmüşler ve bunun radyolojik olarak farklı iki schwannoma tipi oluşumunda önemli olabileceğini belirtmişlerdir.

Epigenetik ve Schwannomalar

Epigenetik değişimlerin özellikle genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarının hipermetilasyonunun birçok tümörün gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Kino ve ark. (13) yaptıkları metilasyon çalışmasında NF2 geninin schwannomaların yaklaşık yarısında metile olduğunu göstermişlerdir. Başka çalışmalarda da daha düşük yüzdeleri olsada NF2 gen metilasyonu gösterilmiştir (7, 14, 16). Bu çalışmaların sonuçları literatürde epigenetik mekanizmaların schwannoma oluşumundan sorumlu olabileceğine dair tam ışık tutmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Fakat kanaatimizce bu düşünme şeklinin yanlışlığındandır. Schwannoma oluşumunda önemli olan NF2 geninin veya onun proteini olan Merlinin normal çalışmasının bozulmasıdır. Bu normalden sapma gen/DNA düzeyinde genin proteini kodlayan (yani ekzon) kısımlarında oluşabilecek farklı çeşitlerde mutasyonlardan kaynaklanacağı gibi, genin çalışmasını sağlayacak bölgelerin (promotor, enhancer, inducer vs.) mutasyonlarında veya epigenetik değişikliklerinde bu genin çalışması bozulabilir (bu durumda genin tüm ekzonları normaldir). Dolayısı ile hangi tümörde ekzonik mutasyon veya epigenetik değişikliğin olacağı bilinemez. Bundan dolayıdır ki, epigenetik değişimlerin schwannoma gelişiminde rol alması istatistiksel bir ihtimal değil, ihmal edilemez bir gerçektir. Biyolojinin bir kısmında istatistik hiçbir anlam ifade etmez.

Knock Out Çalışmaları

Ahmad ve ark. (2) İnsan schwann hücre kültürlerinde küçük engelleyici RNA metodu ile Merlin proteinini fonksiyonunu engelleyen çalışma yapmışlardır. Merlin protein fonksiyonunun engellendiği hücrelerde proliferasyonun, EGFR, ErbB2, ErbB3, CD44 ve nestin'in arttığı bildirilmiştir. Bu durumun bir dediferansiyasyon durumuna yol açtığı ve schwannoma tümörögenezine giden kritik bir süreç olduğunu düşünmüşlerdir. Lallemand ve ark. (15) fare schwann hücrelerinde NF2 genini koşullu devre dışı bırakma çalışmaları sürdürmüşler, Merlin proteininde görülen azalmanın ErbB ve PDGFR reseptörlerinin birikmesiyle sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Sıçanlarda yapılan NF2 geninin yıkımına yol açan çalışmalarda homozigot (her iki allelin de hasarlandığı) mutant sıçanların erken embriyonik gelişim esnasında öldüğü görülmüştür. heterozigot (tek allelin etkilendiği) mutant sıçanlarda ise yüksek sıklıkta kemik tümörlerinin geliştiği görülmüştür. Koşullu NF2 gen yıkımı sağlanan sıçanlarda NF2 hastalarında görülen schwann hücre hiperplazisi, schwann hücre tümörleri, katarakt ve serebral kalsifikasyon gözlemlenmiştir (8).

Yapılmış tüm bu çalışmalara rağmen schwannoma tümörögenesi biyolojinin tüm seviyelerinde tam ortaya konulamamıştır.

Farklı lokalizasyondaki schwannomaların aynı mekanizmalarla mı ortaya çıktığı ve ilave yolların var olup olmadığı bugün için bilinmemekte olup, ileri çalışmaları beklemektedir. Yapılacak çalışmalar sadece schwannomalarda değil diğer tümör gruplarında da aydınlatıcı olacaktır.

■ KAYNAKLAR

1. Agnihotri S, Gugel I, Remke M, Bornemann A, Pantazis G, Mack SC, Shih D, Singh SK, Sabha N, Taylor MD, Tatagiba M, Zadeh G, Krischek B: Gene-expression profiling elucidates molecular signaling networks that can be therapeutically targeted in vestibular schwannoma. *J Neurosurg* 121: 1434-1445, 2014
2. Ahmad Z, Brown CM, Patel AK, Ryan AF, Ongkeko R, Doherty JK: Merlin knockdown in human Schwann cells: Clues to vestibular schwannoma tumorigenesis. *Otol Neurotol* 31: 460-466, 2010
3. Ammoun S, Schmid MC, Ristic N, Zhou L, Hilton D, Ercolano E, Carroll C, Hanemann CO: The role of insulin-like growth factors signaling in merlin-deficient human schwannomas. *Glia* 60: 1721-1733, 2012
4. Blair KJ, Kiang A, Wang-Rodriguez J, Yu MA, Doherty JK, Ongkeko WM: EGF and bFGF promote invasion that is modulated by PI3/Akt kinase and Erk in vestibular schwannoma. *Otol Neurotol* 32: 308-314, 2011
5. Chen Z, Sui J, Zhang F, Zhang CG: Cullin family proteins and tumorigenesis: Genetic association and molecular mechanisms. *Journal of Cancer* 6: 233-242, 2015
6. de Vries M, van der Mey AG, Hogendoorn PC: Tumor biology of vestibular schwannoma: A review of experimental data on the determinants of tumor genesis and growth characteristics. *Otol Neurotol* 36: 1128-1136, 2015
7. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Alonso ME, Lomas J, Arjona D, de Campos JM, Vaquero J, Isla A, Lassaletta L, Gutierrez M, Sarasa JL, Rey JA: CpG island methylation in sporadic and neurofibromatosis type 2-associated schwannomas. *Clinical Cancer Research* 9: 5601-5606, 2003
8. Gutmann DH, Giovannini M: Mouse models of neurofibromatosis 1 and 2. *Neoplasia* 4: 279-290, 2002
9. Irving RM, Moffat DA, Hardy DG, Barton DE, Xuereb JH, Maher ER: Somatic NF2 gene mutations in familial and non-familial vestibular schwannoma. *Hum Mol Genet* 3: 347-350, 1994
10. Jacoby LB, MacCollin M, Barone R, Ramesh V, Gusella JF: Frequency and distribution of NF2 mutations in schwannomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 45-55, 1996
11. James MF, Han S, Polizzano C, Plotkin SR, Manning BD, Stemmer-Rachamimov AO, Gusella JF, Ramesh V: NF2/merlin is a novel negative regulator of mTOR complex 1, and activation of mTORC1 is associated with meningioma and schwannoma growth. *Mol Cell Biol* 29: 4250-4261, 2009
12. James MF, Stivison E, Beauchamp R, Han S, Li H, Wallace MR, Gusella JF, Stemmer-Rachamimov AO, Ramesh V: Regulation of mTOR complex 2 signaling in neurofibromatosis 2-deficient target cell types. *Mol Cancer Res* 10: 649-659, 2012
13. Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T, Saito Y, Kochi M, Kuratsu J, Saya H, Ushio Y: Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes to Cells* 6: 441-454, 2001
14. Kullar PJ, Pearson DM, Malley DS, Collins VP, Ichimura K: CpG island hypermethylation of the neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is rare in sporadic vestibular schwannomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36: 505-514, 2010
15. Lallemand D, Manent J, Couvelard A, Watilliaux A, Siena M, Chareyre F, Lampin A, Niwa-Kawakita M, Kalamarides M, Giovannini M: Merlin regulates transmembrane receptor accumulation and signaling at the plasma membrane in primary mouse Schwann cells and in human schwannomas. *Oncogene* 28: 854-865, 2009
16. Lee JD, Kwon TJ, Kim UK, Lee WS: Genetic and epigenetic alterations of the NF2 gene in sporadic vestibular schwannomas. *PLoS One* 7(1):e30418, 2012
17. Li W, Cooper J, Karajannis MA, Giancotti FG: Merlin: A tumour suppressor with functions at the cell cortex and in the nucleus. *EMBO Rep* 13: 204-215, 2012
18. Petrilli AM, Fernandez-Valle C: Role of Merlin/NF2 inactivation in tumor biology. *Oncogene* 2015 Apr 20. doi:10.1038/ncr.2015.125 (Epub ahead of print)
19. Welling DB, Guida M, Goll F, Pearl DK, Glasscock ME, Pappas DG, Linthicum FH, Rogers D, Prior TW: Mutational spectrum in the neurofibromatosis type 2 gene in sporadic and familial schwannomas. *Hum Genet* 98:189-193, 1996
20. Zhang Z, Wang Z, Sun L, Li X, Huang Q, Yang T, Wu H: Mutation spectrum and differential gene expression in cystic and solid vestibular schwannoma. *Genet Med* 16: 264-270, 2014