

**dr n. med. Joanna PIERZAK-SOMINKA<sup>a</sup>, Prof. dr hab. n. med. Jacek RUDNICKI<sup>a</sup>  
lek. Małgorzata Anna CZAJKOWSKA<sup>a</sup>, dr n. tech. Andrzej Antoni CZAJKOWSKI<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Pomorski Uniwersytet Medyczny, Klinika Patologii Noworodka, Katedra Położnictwa, Ginekologii i Neonatologii  
Pomeranian Medical University in Szczecin, Department of Newborn Pathology, Faculty of Obstetrics, Gynaecology and Neonatology

<sup>b</sup> Uniwersytet Szczeciński, Wydział Matematyczno-Fizyczny, Katedra Edukacji Informatycznej i Technicznej  
University of Szczecin, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Informatics and Technical Education

## **ROLA POLIMORFIZMÓW GENÓW MCPH1 I ASPM/MCPH5 W ROZWOJU MÓZGOWIA**

### **Streszczenie**

**Wstęp i cele:** Adaptacja ewolucyjna anatomii mózgowia u człowieka rozumnego właściwego pozostaje w zależności z genetycznymi regulatorami rozwoju objętości mózgowia. Do puli genów ewolucyjnych wykazujących zaangażowanie w procesy dotyczące modulowania rozmiaru mózgowia, a w szczególności powierzchni kory mózgu oraz ewolucji neocortex należą geny: MCPH1 i ASPM/MCPH5. Głównym celem jest ocena roli wybranych polimorfizmów genów ASPM i MCPH1 w kształtowaniu cech strukturalnych i funkcjonalnych mózgowia.

**Materiał i metody:** Wybrane polimorfizmy genów: ASPM [rs3762271], MCPH1 [rs930557] identyfikowano metodą PCR-RFLP (*polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*) z zastosowaniem swoistych par starterów. Identyfikację polimorfizmów genów ASPM [rs3762271] i MCPH1 [rs930557] przeprowadzono w oparciu o metody opracowane i zoptymalizowane w laboratorium Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej PUM w Szczecinie.

**Wyniki:** Identyfikacja polimorfizmów genów ASPM [rs3762271] i MCPH1 [rs930557] przeprowadzono w oparciu o metody opracowane i zoptymalizowane w laboratorium Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej PUM w Szczecinie.

**Wniosek:** Wybrane polimorfizmy genów ASPM i MCPH1 powinno się zbadać w aspekcie kształtowania cech strukturalnych i funkcjonalnych mózgowia.

**Słowa kluczowe:** ASPM, MCPH1, rozwój mózgowia.

(Otrzymano: 01.07.2012; Zrecenzowano: 15.07.2012; Zaakceptowano: 31.07.2012)

## **ROLE OF POLYMORPHISMS OF MCPH1 AND ASPM/MCPH5 IN THE BRAIN DEVELOPMENT**

### **Abstract**

**Introduction and aims:** Evolutionary adaptation of the anatomy of the brain in humans proper relationship with the development of genetic regulators of brain volume. The gene pool showing the evolutionary processes involved in the modulation of the size of the brain, especially the cerebral cortex area of the neocortex and evolution of genes include: MCPH1 and ASPM/MCPH5. The main aim is to evaluate the role of polymorphisms of selected genes ASPM and MCPH one in the development of structural and functional characteristics of the brain.

**Material and methods:** Selected gene polymorphisms: ASPM [rs3762271], MCPH1 [rs930557] were identified by PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) using specific primer pairs. Identification of the ASPM gene polymorphisms [rs3762271] and MCPH1 [rs930557] was based on methods developed and optimized in the laboratory of the Department of Clinical Biochemistry and Molecular Department of Laboratory Diagnostics and Molecular Medicine PUM in Szczecin.

**Results:** Identification of the ASPM gene polymorphisms [rs3762271] and MCPH1 [rs930557] conducted based on methods developed and optimized in the laboratory of the Department of Clinical Biochemistry and Department of Laboratory Diagnostics and Molecular Medicine PUM in Szczecin.

**Conclusion:** Selected polymorphisms of genes ASPM and MCPH one should be explored in the aspect of shaping structural and functional characteristics of the brain.

**Keywords:** ASPM, MCPH1, brain development.

(Received: 01.07.2012; Revised: 15.07.2012; Accepted: 31.07.2012)

## 1. Wstęp

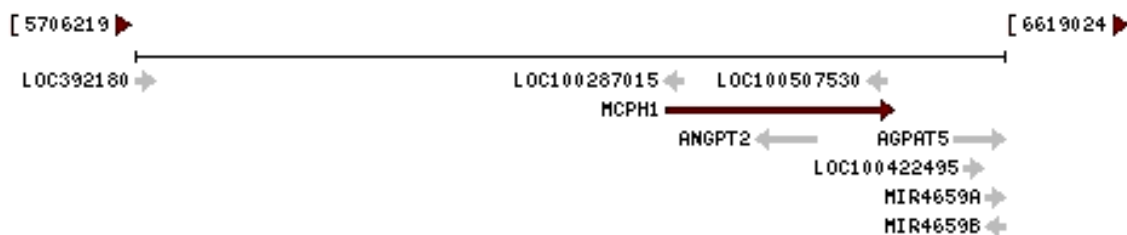
Adaptacja ewolucyjna anatomii mózgowia u człowieka rozumnego właściwego pozostaje w zależności z genetycznymi regulatorami rozwoju objętości mózgowia. Do puli genów ewolucyjnych wykazujących zaangażowanie w procesy dotyczące modulowania rozmiaru mózgowia, a w szczególności powierzchni kory mózgu oraz ewolucji *neocortex* należą geny: *MCPH1* i *ASPM/MCPH5* [1]-[4].

Według relacji między innymi *Wanga* geny *MCPH1* i *ASPM/MCPH5* w głównej mierze odpowiedzialne są za wielkość i budowę anatomiczną mózgowia *Homo sapiens sapiens* [5], a mutacje w tych genach są jedną z przyczyn występowania pierwotnego małogłowa dziedziczonego autosomalnie recesywnie i opóźnienia umysłowego [6]-[8]. Geny *MCPH1* i *ASPM/MCPH5* są współcześnie intensywnie analizowane genetycznie i stanowią interesujący aspekt w wyjaśnieniu toru ewolucyjnego rozwoju mózgu w linii od *Homo neanderthalensis* do *Homo sapiens sapiens*.

Gen *MCPH1* został odkryty przez *Rogera Woodsa* u pacjentów pochodzenia pakistańskiego [9]. Gen *MCPH1* zmapowano na chromosomie 8p23.1 [3]. Składa się on z 14 eksonów. W literaturze tematu obecny jest również pod postacią synonimów: *BRIT1*; *FLJ12847*; *MCT*. Białko *mikrocefalina*, kodowane przez gen *MCPH1*, składa się 835 aminokwasów. *Mikrocefalina* nadzoruje proliferację, a także różnicowanie neuroblastów w trakcie *neurogenezy*. Dokładna rola genu *MCPH1* podczas mitozy neuronów nie jest jednak jeszcze dokładnie poznana [3], [9].

*Mikrocefalina* obok kontroli cyklu komórkowego [10], spełnia także funkcję naprawy DNA. Czas trwania cyklu komórkowego i *neurogenezy* ma, bowiem kluczowe znaczenie w kształtowaniu się całkowitej liczby komórek kory mózgowej. Fenotyp pacjentów z *MCPH* może wynikać z zaburzeń regulacji cyklu komórkowego w neuronalnych *komórkach progenitorowych* [7]. *Mikrocefalina* ulega ekspresji podczas rozwoju kory mózgowej, już w okresie prenatalnym [9]. Białko to ulega ekspresji zarówno w mózgu płodu (w proliferowanej strefie mózgu embriona [7]), ale jak dowodzą liczne badania, również w wątrobie, nerkach oraz na niskim poziomie ekspresji w innych tkankach płodu i osobników dorosłych [9]. Najbardziej widoczna ekspresja *mikrocefaliny* jest skoncentrowana w przodomózgowiu (*prosencephalon*), a zwłaszcza w ścianach rozwijających się komór bocznych, gdyż są to regiony szczególnie aktywnej *neurogenezy* [7].

Według *Trimborna* [11] komórki uczestniczące w tym podziale wytwarzają neurony, które ostatecznie migrują z kory mózgowej. Taki wzór ekspresji zdaniem *Jacksona* jest zgodny z rolą tego genu w kształtowaniu objętości mózgowia podczas rozwoju [12]. Dotychczasowe badania ukazują, że zmiany ewolucyjne w genach *MCPH1* przyczyniły się do dużej wielkości mózgu u ssaków naczelnych, a w szczególności u ludzi [13]. Mutacje genu *MCPH1* związane są z uproszczeniem struktury kory mózgowej oraz nieznacznym zmniejszeniem objętości istoty białej współlistniejące ze zmniejszeniem rozmiaru mózgu [14].



Rys. 1. *MCPH1* lokalizacja, 8p23.1

Fig. 1. *MCPH1* localisation, 8p23.1

Źródło (Source): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79648>

Gen *ASPM/MCPH5* zmapowany został na chromosomie 1q31.3 [15]. Składa się z 28 eks-onów. Białko kodowane przez gen *ASPM* zbudowane jest 3477 aminokwasów [16].

Mutacje genu *ASPM/MCPH5* odpowiedzialne są za występowanie pierwotnej mikrocefalii dziedzicznej w sposób autosomalny recesywny. Mutacje *ASPM/MCPH5* są rozłożone w całym genie. Nie wykazano korelacji pomiędzy pozycją mutacji w genie, a stopniem małowłówa lub niedorozwoju umysłowego [17].

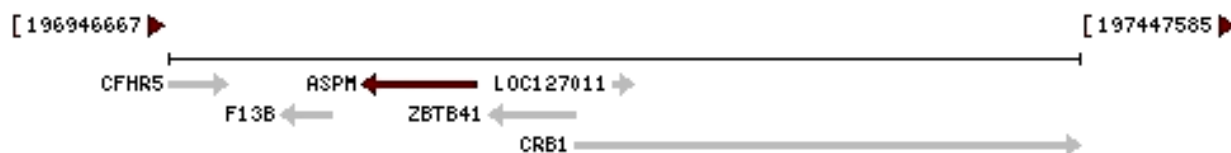
*Colin Groves*, specjalista w zakresie ewolucji stwierdził, że rozmiar ludzkiego mózgu zaczął wzrastać z chwilą pojawienia się *Homo habilis*. Zatem różnice w rozmiarze mózgowia w kontekście ewolucyjnym pozwalają wnioskować o inteligencji tylko w porównaniach międzygatunkowych [18]. Żadna struktura neuroanatomiczna nie determinuje, bowiem ogólnego poziomu inteligencji, a odmienne typy budowy mózgowia są zdolne do podobnej aktywności intelektualnej [19].

Zmienność *ASPM/MCPH5* wskazuje na działanie *selekcji pozytywnej* [13]. Pojawienie się najmłodszych ewolucyjnie alleli genu *ASPM* szacuje się na 5800 lat temu i zdumiewający jest fakt, że czas ten związany jest także z pojawieniem się „języka pisanego”.

Nie istnieją natomiast żadne dowody naukowe, które potwierdzałyby wpływ tych genów na poziom inteligencji [19], [20]. *Dedieu* i *Ladd* zasugerowali jednak, że skutkiem ich działania mogą być również obserwowane minimalne różnice w budowie kory mózgowej, w obszarach związanych z ośrodkiem mowy [21].

Najsilniejsza ekspresja genu *ASPM* zachodzi między 11 a 17 dniem życia płodowego. Po urodzeniu zmniejsza się w odpowiedzi na zakończenie *neurogenezy* i aktywację *gliogenezy* w korze mózgowej.

Dowodzi to zaangażowania *ASPM* w proces *neurogenezy*, a nie produkcję komórek *glejowych*. *ASPM* znajduje się blisko centromeru i pełni niezbędną funkcję w organizacji mikrotubul biegunów wrzeciona podziałowego oraz wrzeciona centralnego w procesie mitozy i mejozy [22]. *ASPM* odgrywa również rolę w utrzymaniu symetrycznych podziałów komórek w proliferowanej tkance nabłonka nerwowego [23], [24].



Rys. 2. *ASPM* lokalizacja, 1q31

Fig. 2. *ASPM* localisation, 1q31

Źródło (Source): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/259266>

Wybrane polimorfizmy genów: *ASPM* [rs3762271], *MCPH1* [rs930557] identyfikowano metodą PCR-RFLP (ang. *polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism*) z zastosowaniem swoistych par starterów (tabela 1).

## 2. Cel

Ocena roli wybranych polimorfizmów genów *ASPM* i *MCPH1* w kształtowaniu cech strukturalnych i funkcjonalnych mózgowia.

### 3. Materiał i metody

Tab. 1. Sekwencje starterów \*

Tab. 1. Sequences of the primers \*

Gen	Polimorfizm	Sekwencje starterów
<i>ASPM</i>	rs3762271	5'-CACCAGGCTGCCATTATTATT-3' 5'-GTTACTGCAGCCCTACTTTGAGA-3'
<i>MCPH</i>	rs930557	5'-TAAAAATACTGGCCTAAAATG-3' 5'-GGAACCTCCTGGGTCTTGA-3'

W eksperymentach wstępnych ustalono optymalne warunki PCR dla poszczególnych par starterów (Tab. 2).

Tab. 2. Warunki amplifikacji \*

Tab. 2. Amplification conditions \*

Gen	Polimorfizm	T <sub>annealingu</sub> (przyłączenia) [°C]	Liczba cykli	Amplikon [pz]
<i>ASPM</i>	rs3762271	55	40	587
<i>MCPH</i>	rs930557	52	38	562

Wszystkie amplifikacje wykonywano w termocyklerze Mastercykler gradient (Eppendorf). Amplifikacje sekwencji genu *ASPM* przeprowadzano w objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej:

- 40 ng genomowego DNA (oznaczono spektrofotometrycznie przy użyciu aparatu *Picodrop*),
- bufor PCR [10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40]
  - (MBI Fermentas),
- dNTP [200 µM] (MBI Fermentas),
- MgCl<sub>2</sub> [1,5 mM] (MBI Fermentas),
- po 4 pmole primera sensownego i antysensownego
  - (synt. TIB MOLBIOL, Poznań),
- 0,5 U polimerazy *Taq* (MBI Fermentas).

Natomiast amplifikacje sekwencji genu *MCPH1* wykonywano w objętości 20 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej:

- 40 ng genomowego DNA,
- bufor PCR (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40) (MBI Fermentas),
- trifosforany dezoksyrybonukleotydów - dNTPs (200 µM) (MBI Fermentas),
- MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) (MBI Fermentas),
- po 4 pmole startera sensownego i antysensownego, flankujących analizowane regiony polimorficzne,
- 0,5 U polimerazy *Taq* (MBI Fermentas),
- DMSO (SIGMA).

W tabeli 3 przedstawiono profil temperaturowo – czasowy dla reakcji PCR.

Tab. 3. Profil temperaturowo - czasowy dla reakcji PCR \*  
Tab. 3. Profile of temperature - time for reaction PCR \*

	I Faza		II Faza						III Faza		Ilość cykli
	Denaturacja wstępna		Denaturacja		Annealing (przyłączania)		Elongacja		Elongacja		
	Temp. [°C]	Czas [min.]	Temp. [°C]	Czas [sek.]	Temp. [°C]	Czas [sek.]	Temp. [°C]	Czas [sek.]	Temp. [°C]	Czas [min.]	
<i>ASPM</i>	94	5	94	30	55	60	72	60	72	8	40
<i>MCPH</i>	94	5	94	20	52	40	72	40	72	8	38

Produkty amplifikacji zostały poddane analizie restrykcyjnej ze stosownie dobranymi enzymami (Tab. 4).

Tab. 4. Warunki analizy restrykcyjnej\*  
Tab. 4. Conditions of restriction analysis \*

Gen	Polimorfizm	Enzym restrykcyjny	Fragmenty restrykcyjne [pz]
<i>ASPM</i>	rs3762271 A/C	DdeI [ 4 U, 37°C, 12 h]	allele A: 473 + 114 allele C: 406 + 114 + 67
<i>MCPH</i>	rs930557 C/G	Rsa I [5 U, 37°C, 12 h]	allele C: 362 + 109 + 75 + 16 allele G: 362 + 184 + 16

#### 4. Wyniki badań i dyskusja

Produkty PCR i fragmenty restrykcyjne rozdzielano elektroforetycznie w odpowiednio stężonym żelu agarozowym, wybarwianym bromkiem etydyny.

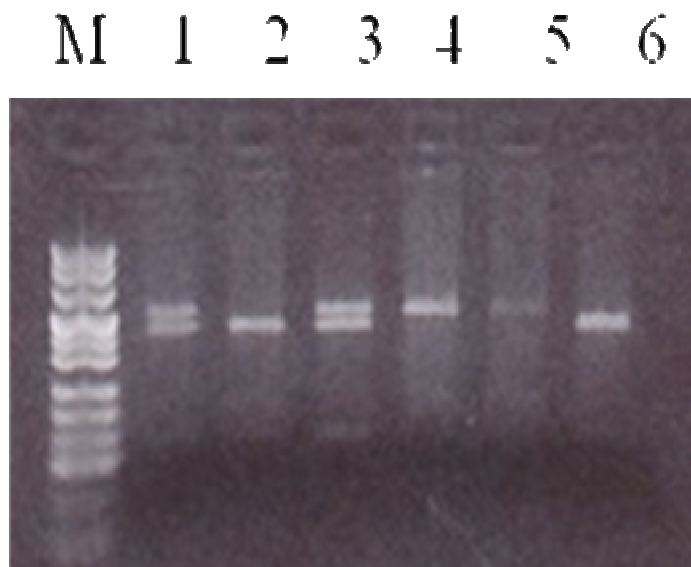
Rozdział prowadzono w buforze 1xTBE [0,089 M Tris, 0,089M kwas borowy, 2mM EDTA, w temperaturze 20°C, przy napięciu 75 V. Długości fragmentów restrykcyjnych określano w oparciu o marker długości DNA – pUC Mix Marker 8 (*MBI Fermentas*).

Końcowym etapem była dokumentacja żelu poprzez sfotografowanie aparatem (*DS-34 Direct Screen Camera*) w systemie Polaroid, w świetle UV (*Transiluminator 4000, Stratagene*). Otrzymane zdjęcia skanowano i zapisywano w postaci plików graficznych z rozszerzeniem \*.jpeg (Rys. 3 i Rys. 4).

\* Wszystkie badania genetyczne zostały wykonane w laboratorium Zakładu Biochemii Klinicznej i Molekularnej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej PUM w Szczecinie. Identyfikację polimorfizmów genów *ASPM* [rs3762271] i *MCPH* [rs930557] przeprowadzono w oparciu o metody opracowane i zoptymalizowane w laboratorium.

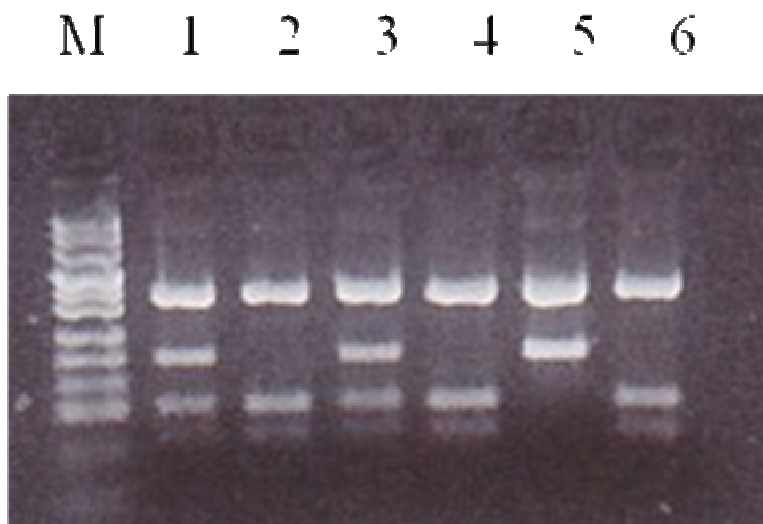
#### 5. Wniosek

Dotychczasowa wiedza dotycząca roli i identyfikacji polimorfizmów genów *ASPM* i *MCPH1* w kształtowaniu cech antropometrycznych noworodka powinna być również oceniana pod kątem ich wpływu na antropologię czynnościową mózgowia.



Rys. 3. Identyfikacja polimorfizmu rs3762271 genu ASPM\*  
Ścieżki: M – marker długości DNA (pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas);  
1,3 – heterozygoty AC; 2,6 – homozygoty CC; 4,5 – homozygoty AA  
*Źródło: Opracowanie Autorów*

Fig. 3. Identification of polymorphism rs3762271 of the gene ASPM \*  
Paths: M – marker długości DNA (pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas);  
1,3 – heterozygotes AC; 2,6 – homozygotes CC; 4,5 – homozygotes AA  
*Source: Elaboration of the Authors*



Rys. 4. Identyfikacja polimorfizmu rs930557 genu MCPH 1\*  
Ścieżki: M - marker długości DNA (pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas)  
1,3 – heterozygoty CG; 2,4,6 – homozygoty CC; 5 – homozygota GG  
*Źródło: Opracowanie Autorów*

Fig. 4. Identification of polymorphism rs930557 of the gene MCPH 1\*  
Paths: M - marker długości DNA (pUC Mix Marker 8, MBI Fermentas)  
1,3 – heterozygotes CG; 2,4,6 – homozygotes CC; 5 – homozygous GG  
*Source: Elaboration of the Authors*

## Literatura

- [1] Woods R.P., Freimer N.B., De Young J.A.: *Normal variants of Microcephalin and ASPM do not account for brain size variability*, Human Molecular Genetics, 2006, Vol. 15, Issue 12, pp. 2025-2029.
- [2] Evans P.D., Gilbert S.L., Mekel-Bobrov N., et al.: *Microcephalin a gen regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans*, Science, 2005, 309 (5741), pp. 1717-1720.
- [3] Rushton J.P., Vernon P.A., Bons T.A.: *No evidence that polymorphisms of brain regulator Microcephalin and ASPM are associated with general mental genes ability, head circumference or altruizm*, Biology Letters 2007, Vol. 3, pp. 157-160.
- [4] Mochida G.H., Walsh Ch.A.: *Molecular genetics of human microcephaly*, Current Opinion in Neurobiology 2001, Vol. 14, pp. 151-156.
- [5] Rimol L. M., Agartz I., Djurović A., et al.: *Sex-depend association of common variants of microcephaly genes with brain structure*, PNAS, 2010 Vol. 107, No. 1, pp. 384-388.
- [6] Woods C.G.: *Human microcephaly*, Current Opision in Neurobiology 2004, Vol. 14, pp. 112-117.
- [7] Leroy J.G., Frias J.L.: *Nonsyndromic Microcephaly: An Overview, Chapter 12*, Advances in Pediatrics, 2005, Vol 52.
- [8] Roberts E., Hampshire D.J., Pattison L., et al.: *Autosomal recessive primary microcephaly: an analysis of locus heterogeneity and phenotypic variation*, Journal of Medical Genetics, 2002, Vol. 39, pp. 718-721.
- [9] Woods C.G., Bond J., Enard W.: *Autosomal Recessive Primary Microcephaly (MCPH): A Review of Clinical, Molecular, and Evolutionary Findings*, The Americal Jurnal of Human Genetics, 2005, Vol. 76, Issue 5, pp.717-728.
- [10] Xu X., Lee J., Stern D.F.: *Microcephalin is a DNA damage response protein involved in regulation of CHK1 and BRCA1*, The Journal of Biological Chemistry, 2004, Vol. 279, pp. 34091-34094.
- [11] Trimborn M.: *Mutations in microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation*, The Americal Jurnal of Human Genetics, 2004, Vol. 75, pp. 261-266.
- [12] Jackson A.P., Eastwood H., Bell S.M., et al.: *Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain*, The Americal Jurnal of Human Genetics 2002, Vol. 71, Issue 1, pp. 136-42.
- [13] Vallender E.J, Lahn B.T.: *Positive selection on the human genome*, Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, Issue 2, pp. R245-R254.
- [14] Bond J., Roberts E., Mochida G.H., et al.: *ASPM is a major determinant of cerebral cortical size*, Nature genetics 2002, Vol. 32, pp. 316-320.
- [15] Wang J., Li Y., Su B.: *A common SNP of MCPH1 is associated with cranial volume variation in Chinese population*, Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, pp. 1329-1335.
- [16] Mahmood S., Ahmad W., Hassan M.J: *Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2011, Vol. 6, p. 39.
- [17] Woods C.G.: *Human microcephaly*, Current Opinion in Neurobiology, 2004, Vol. 14, pp. 112-117.

- [18] Timpson N., Heron J., Smith G.D. et al.: Comment on Papers by Evans et al. and Mekel-Bobrov et al. *On Evidence for Positive Selection of MCPHI and ASPM*. Science 24 August 2007, Vol. 317, No. 5841, p. 1036 .
- [19] Mekel-Bobrov N., Posthuma D., Gilbert S. L. et al.: *The ongoing adaptive evolution of ASPM and Microcephalin is not explained by increased intelligence*. HMG Advance Access Published, 2007, p. 12.
- [20] Currat M., Excoffier L., Maddison W.: *Comment on ongoing adaptive evolution of ASPM, a brain size determinant in Homo sapiens and Microcephalin, a gene regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans; Comment on Ongoing adaptive evolution of ASPM, a brain size determinant in Homo sapiens and Microcephalin, a gene regulating brain size, continues to evolve adaptively in humans*, Science, 2006, Vol.313 (5784), p. 172.
- [21] Dediu R., Ladd D.: *Linguistic tone is related to the population frequency of the adaptive haplogroups of two brain size genes, ASPM and Microcephalin*, PNAS, 2007, 104, pp. 10944-10949.
- [22] Cox J., Jackson A.P., Bond J., et al.: *What primary microcephaly can tell us about brain growth*. Trends in Molecular Medicine, 2006, Vol. 8, pp. 358-366.
- [23] Kornack D.R.: *Neurogenesis and the evolution of cortical diversity: mode, tempo and partitioning during development and persistence in adulthood*, Brain, Behavior and Evolution, 2000, Vol. 55, No. 6, pp. 336-344.
- [24] Evans P.D., Anderson, J.R., Vallender E.J., et al.: *Reconstructing the evolutionary history of microcephalin, a gene controlling human brain size*, Human Molecular Genetics, 2004, Vol. 13, No. 11, pp. 1139-1145.