



## GENETIC PREDICTION OF PIGMENTARY TRAITS IN FORENSIC STUDIES

Wojciech BRANICKI<sup>1</sup>, Urszula BRUDNIK<sup>2</sup>, Anna WOJAS-PELC<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Forensic Research, Krakow*

<sup>2</sup> *Faculty of Dermatology, Collegium Medicum, Jagiellonian University, Krakow*

### Abstract

Examinations of highly variable STR sequences and complementary analysis of mtDNA markers that are very resistant to degradation processes are standard procedures used in contemporary forensic laboratories. Single nucleotide polymorphisms are considered as very attractive additional markers utilised especially in the analysis of heavily degraded specimens. Moreover, progress that has recently been made in studies on correlations between genetics and some phenotypic features has opened up new opportunities for application of SNP markers in forensic studies. Determination of physical features on the basis of DNA analysis would seem to be useful in criminal investigations where a reliable description of the offender(s) is not available, as well as in forensic anthropological studies. Genetic determination of pigmentary status, one of the most variable human traits, seems to be of special interest for these purposes. The present article discusses these new opportunities emerging in forensic genetics, with a focus on associations between genetics and pigmentation.

### Key words

Physical traits; Pigmentation genes; Single nucleotide polymorphisms; Genetic prediction.

*Received 15 December 2005; accepted 30 December 2005*

### 1. Introduction

Contemporary forensic genetics has developed efficient and reliable methods of human identification based on DNA analysis. Applied tests rely on examination of highly polymorphic DNA sequences, mainly microsatellite regions of nuclear DNA and variable sequences of the control region of mitochondrial DNA [3, 13]. Significant technological progress observed in this field over the last decade has resulted in development of scientific procedures enabling analysis of practically every kind of biological material. The extremely high sensitivity of the optimised assays has opened up the possibility of analysis of biological traces containing tiny amounts of DNA as well as samples affected by strong degradation processes. The

power of discrimination associated with examinations based on STR sequences (Short Tandem Repeats) is usually very high, giving significant evidential value to genetic examinations. The significance of evidence based on DNA analysis for today's justice system is hard to overestimate. There are known cases of wrongly convicted persons, who had been judged on the basis of subjective evidence, such as that given by a victim or eye witness. Unfairly convicted persons have been exonerated today thanks to repeated examination of evidence material and analysis of biological samples [52]: very reliable DNA evidence has enabled definite exclusion of their involvement in a crime (sometimes after many years of wrongful imprisonment). The idea of national DNA databases, originally initiated in the United Kingdom, has also turned out to

be a great success of the justice system [14, 38]. National DNA databases are currently successfully operated in most developed countries. At the current stage of development of forensic genetics it is worth looking at the prospects for this scientific field.

## 2. Single nucleotide polymorphism

Single nucleotide polymorphism (SNP) is a type of variation that is different in nature from STR sequences and is currently of special interest to forensic geneticists. Work on sequencing of the complete human genome has revealed more than 1.5 billion single nucleotide polymorphisms [35]. They constitute the basic and most common type of genetic variation.

The nucleotide position is recognised as SNP when frequency of the rare variant reaches the level of 1%; this rule was decided on in order to omit very rare point mutations. It is assessed that single nucleotide polymorphisms occur with a frequency of 1 per 200–300 base pairs [61].

Up to now forensic geneticists have focused on SNPs located in non-coding regions of DNA, looking for variation in them that has the potential to replace standard STR analysis in future applications. The advantages and disadvantages of such a change of technology have been widely discussed. The advantages include: the possibility of increased automation of analysis, further miniaturisation of the equipment necessary for analysis and improved sensitivity (the length of analysed DNA fragments can be shorter than 100 base pairs). One also has to be aware of the significant drawbacks resulting from a change of analytical methodologies: the significant cost of such a change (much money was invested in order to set up DNA databases based on STR technology), difficulties with analysis of DNA mixtures by SNP technology, the necessity of examination of 50 to 100 loci instead of 10–16 loci analysed with present technology and problems with establishing a standard panel of markers giving equally high discrimination power for populations of different ethnicity [20, 57]. The official document issued by ENFSI (European Network of Forensic Science Institutes) stated that in the near future replacing analysis of STR by SNP is not foreseen [21]. In spite of this, research in this direction continues and new identification assays based on SNP technology are being developed. These tests are designed, above all, for examination of heavily degraded specimens [16, 39]. It seems that SNP variation might in the future be a source of an additional set of polymorphic markers that could be useful in particular circumstances. Most

of the above mentioned limitations associated with single nucleotide polymorphisms do not apply to utilisation of SNP technology in paternity cases. The real breakthrough may be associated with analysis of SNP type variation utilised not in the context of genetic identification, but in order to determine the personal traits of the person who is the source of the DNA sample. Forensic geneticists are accustomed to the fact that the analysed DNA sequence is comprised of so-called non-coding DNA and hence no phenotypic features of the donor are identified. The only exception to this rule is the widely used amelogenin marker analysed for the purpose of sex determination. It is widely known that a description of the perpetrator given by eye witnesses may have significant value for an investigation. In many cases, however, there are no witnesses, which often makes it difficult to single out suspects in the case and in effect slows down the investigation or may even lead to its suspension. Biological traces deposited at the scene of a crime enable us to retrieve the genetic profile of the perpetrator, but this data is of minor significance because of a lack of reference material. In many (such) cases it has been necessary to perform broad screening of DNA profiles for reference samples collected from citizens living in the area where the crime has been committed [15]. The process of narrowing down the circle of suspects, which is above all important for quick capturing of the perpetrator and also for economical reasons, is usually limited to psychological profiling. In rape cases this often means that only males within a limited age range are included in DNA examinations. As mentioned in the introduction, a description of a perpetrator given by a victim or a witness might not be reliable. Confirmation of such evidence by genetic analysis may constitute a very useful tool, giving additional information and limiting the number of errors in the investigation.

## 3. Examination of SNPs in coding DNA regions

Thanks to enormous progress in research on the human genome, the idea of describing the perpetrator's features by analysis of a biological trace deposited on the crime scene is starting to become a real possibility. Most single nucleotide polymorphisms are located in non-coding regions. However, it is estimated that at least 100,000 are located within genes. Nonsynonymous DNA alterations within genes result in polymorphism in the polypeptide chain leading to changes in functioning of the protein product and differences in phenotype characteristic of particular individuals. Phenotype differences may also be caused by substitu-

tions of nucleotides located in promotor and regulatory regions of genes, which can affect the level of gene expression and stability of a transcript. Studies concerning relations between genes and individual features are mostly focused on susceptibility to diseases linked with the carried genetic variant as well as differences in response to drugs characteristic of patients [5, 48].

Particular genetic variants are also undeniably correlated with natural phenotypic differences (relating to many different physical features) existing in the human population. Determination of this kind of individual feature on the basis of DNA examination of a biological specimen could supply significant information to investigators and narrow down the number of suspects or guide the investigation in a particular direction. Such studies should be considered as useful at the level of investigation, but should not be used in the preparation of a typical expert report [J. Wójcickiewicz – personal communication].

Prediction of physical traits by DNA analysis may also provide significant complementary information to anthropological examinations, enabling reconstruction of the human appearance on the basis of skeletal remains, and it would seem that in this case a typical expert report would be required. Multigenic inheritance and the varying influence of environmental factors on the final phenotype are important issues associated with genetic determination of human traits. Studies on twins are very useful in the evaluation of the balance between the influence of genetic and environmental factors on actual phenotypic features [55, 59, 63].

The current state of knowledge enables analysis of even complex physical traits with a quantitative mode of inheritance: their analysis may in future be useful in forensic genetics. The (body) build of the perpetrator is obviously an important component of his/her description – hence genetic determination of height or weight of an individual who has deposited biological traces on the scene of crime would seem to be very desirable [55]. There are some papers being published about correlations between particular alleles of the LEP gene (leptin OMIM 164160) and pathological obesity, but these results need further research and at this stage it would be premature to consider their practical application [26]. Different studies indicate that other features are under genetic control to a high degree. In future, DNA analysis should open up the possibility of prediction of even minor phenotype differences between humans such as skull, ear and nose shape, or left- or right-handedness. There are also scientific reports on correlations between particular

genetic variants and susceptibility to aggressive behaviour or depression [2, 10, 40, 51]. Analysis of physical traits seems to be technically easier and raise less ethical objections than analysis of psychological features. Moreover, genetic determination of physical features is undisputed and the influence of environmental factors may be disregarded: an excellent example of the minor influence of environmental factors on physical phenotype is identical twins. The level of knowledge concerning genes involved in control of physical features is particularly significant in the case of human pigmentation.

#### 4. Human pigmentary phenotype

Significant progress has been noted in recent years in studies on the correlation between genetics and the pigmentary phenotype. This opens up the possibility of practical application of this knowledge in the relatively near future in different disciplines, including forensic science. Data concerning skin, hair and eye colour would seem to be of great importance in the description of a perpetrator or a missing person. This is because variation in pigment phenotype is apparently one of the most expressive polymorphic traits. Pigment-related issues are undoubtedly interesting for scientists from different scientific fields, as they are linked with such issues as inheritance and evolutionary processes, phylogeographic and migration studies, population substructure, and also the correlation between pigment strength and susceptibility to cancer [8, 9, 25, 43, 56].

The variation in pigment phenotype that is easily visible in the human population originates above all from differences in melanin content. Its amount, type and distribution is of crucial importance for pigment intensity. Melanin is a polymer synthesised from tyrosine derivatives in specialised cells called melanocytes. Melanocytes are characteristic for skin, hair bulbs, iris and eye epithelium. Two types of melanin are known – pheomelanin, which is red or yellow and eumelanin, which is black or brown. A significant excess of pheomelanin is expressed in a characteristic pigmentary phenotype – pale skin often associated with freckles and red hair colour. Excess of eumelanin manifests itself in dark hair, darker skin and, usually, brown eyes. The produced pigment accumulates in melanosomes, which are then moved to the keratinocytes. It is assumed that more than 120 genes are involved in determination of the pigmentary phenotype [41, 53]. So far a few genes that significantly affect the melanin content in humans have been studied. It is as-

sumed that genetic variation within these genes may be responsible for phenotype differentiation in humans. To date, thorough studies have been carried out on variance and its influence on natural phenotype differentiation in the case of one gene encoding the melanocortin 1 receptor (MC1R). The melanocortin 1 receptor is bound to the membrane of melanocytes, which are involved, as previously mentioned, in melanin production. The MC1R is activated via  $\alpha$ -MSH (melanocyte stimulating hormone). Its activation leads to increase of eumelanin synthesis and simultaneous decrease of pheomelanin production [4]. The MC1R gene consists of a single, short DNA fragment of 951 bp, thus analysis of the complete gene is not technically difficult. Genetic studies have shown that the carried receptor variant has a significant influence on skin type and hair colour. World-wide population studies have revealed several dozen MC1R alleles [30, 49, 63]. The literature data indicates that a few of these are related to the pigmentary phenotype characterised by red hair and pale skin. Individuals characterised by these features are more sensitive to UV irradiation and more prone to sunburn. This is because such a pigmentary phenotype is caused by an excess of pheomelanin over eumelanin. It has been shown that eumelanin reveals strong photoprotective properties, whereas pheomelanin subjected to UV irradiation is conducive to generation of free radicals [46].

There is a concordance among researchers that mutations C451T, C478T and G880A have a key significance in the determination of such pigmentation [50, 66]. The percentage of red-haired individuals in the United Kingdom who have two of the above mentioned mutations equals about 96% [23]. Data obtained for the Polish population indicates that this value may be even higher and reach 98%. Studies performed on the Polish population sample of red headed individuals confirm the significant role of these mutations and show that a few other MC1R variants strongly predispose to red hair colour [7]. These studies showed that determination of some MC1R variants in a sample of unknown origin might be useful for prediction of the pigmentary phenotype of the person who is its source. Heterozygous individuals who are characterised by one reference variant and a second mutated one may reveal strawberry blond hair. Moreover, male individuals with such a genetic background may have red beards. The MC1R gene is not the only gene linked to the issue of red hair colour inheritance. On the contrary, in the case of populations with darker skin, an individual with two mutated red hair MC1R variant alleles does not necessarily manifest red hair [44]. Difficulties with unambiguous genetic prediction

of red hair colour are caused by the influence of other genes in determination of the pigmentary phenotype. POMC (OMIM 176830), the precursor of the  $\alpha$ -MSH receptor involved in activation of the MC1R, is a gene which has also been linked to red hair colour [33]. However, its role in determination of red hair colour is rather small. Variants of this gene are more often correlated with metabolism disorders, obesity and other disturbances [34]. The influence of MC1R polymorphisms on eye colour is still uncertain. Some studies have indicated correlation of single MC1R mutations with blue eye colour [32, 67]. Many other studies do not support this finding and have not revealed any links between MC1R variants and eye colour [e.g. 60]. A paper published by Frudakis et al. presents results indicating a correlation between the MC1R and iris colour, but not at the level of single mutations, but haplotypes. Moreover, they noted an association not with blue but green eye colour [18].

Data available for other pigment-related genes refers mainly to pathological states and little is known about their influence on natural human pigment variation. A single gene dysfunction may lead to disturbance of a significant metabolic pathway and, in consequence, illness, e.g. albinism. In contrast, eye colour is determined in classical multigenic fashion and is a result of co-operation between many genes. There are four types of albinism defined, and each of them is caused by mutations in a different gene. However, it seems that genes responsible for disorders in human pigmentation also influence natural variation among humans in eye and hair colour or skin type. This assumption is now being confirmed by successive studies. The oxidative enzyme tyrosinase – TYR (OMIM 606933) is involved in tyrosine oxidation, a crucial step in the process of eumelanin and pheomelanin synthesis. The tyrosinase gene is more complicated than the previously described MC1R gene. It consists of 5 distant DNA fragments, which makes its analysis a bit more complicated than analysis of the MC1R. Serious loss-of-function mutations of this gene lead to extreme albinism classified as oculocutaneous albinism type 1A. Mutations of the TYR gene which merely decrease enzyme activity are also known. In this case, patients reveal more gentle symptoms and this albinism has been classified as 1B [41]. Several dozen TYR mutations involved in albinism have been described in total. However, literature data does not relate to associations between TYR variation and differences in natural pigmentation. Recent studies indicate that gene OCA2 (oculocutaneous albinism type 2, OMIM 203200) shows a strong modulatory effect on the MC1R. The OCA2 encodes a protein bound with

the melanosome membrane and is assumed to significantly influence pigment synthesis. The gene consists of 24 distant DNA fragments (exons) spread over a relatively long distance of 267 thousand base pairs [36]. The gene encodes P protein binding with the cellular membrane, comprising 12 transmembrane regions. The OCA2 gene is very polymorphic. Sequencing of the human genome has revealed more than 200 single nucleotide polymorphisms within the gene. So far correlations between some polymorphic DNA positions of the OCA2 and type 2 albinism have been shown [42]. In the case of this gene, knowledge relating to polymorphisms correlated with natural pigment variation is a bit more significant. Large-scale studies on twins have shown that the OCA2 is responsible for more than 70% variation in eye colour of the human population [69]. Some earlier papers also suggested correlations between the OCA2 and eye colour. It was shown that two mutations within the OCA2, in exons 9 and 13 respectively, are involved in determination of eye colour other than blue [47]. Another team of scientists determined 10 different nucleotide positions of the OCA2 gene which are significantly correlated with eye colour inheritance [19]. The literature data suggests co-operation between the MC1R and the OCA2 genes in determination of the ultimate phenotype [1, 17, 31]. Frudakis' team also showed that some TYRP1 (tyrosinase related protein 1, OMIM 115501) variants show strong association with iris colour [19]. There were some earlier indications that this gene may be responsible for premature greying [27]. The gene is located on chromosome 9p23 and consists of 7 exons spread out over a section of 24 base pairs [62]. The influence of the TYRP1 gene on natural differentiation in pigmentation has also been shown in the case of animals [12, 37]. Some variants of this gene are associated in humans with a pigment disorder that has been classified as type 3 albinism. Apart from the OCA2 gene, gene MATP (membrane associated transporter protein, OMIM 606202) also has a significant regulatory role. This gene affects the access of appropriate amounts of substrates which are necessary for melanin synthesis, as well as its positive regulation. The human MATP gene consists of 7 DNA fragments. The composition of the MATP protein indicates that this is a typical transporting protein. The MATP is bound with the melanosome membrane (like the OCA2 protein, it crosses the membrane 12 times) and most probably is involved in the process of melanin synthesis. MATP mutations related to typical symptoms characteristic of oculocutaneous albinism similar to that evoked by mutated P protein have been described. Albinism caused by mutations in the MATP gene has

been classified as type 4 albinism and this type has been found in different populations, including a European population sample [e.g. 54]. The first paper presenting a correlation between some MATP variants and human natural pigmentation appeared recently [22]. Such associations were also reported for mice and therefore it seems that geneticists should focus on the MATP gene and its potential relations with natural pigmentation.

ASIP (agouti signalling protein, OMIM 600201) is a gene consisting of 4 DNA fragments encoding protein involved in the process of melanin synthesis. By binding to the Mc1r receptor, the Asip protein prevents action of the  $\alpha$ -MSH hormone, which leads to a decrease in eumelanin synthesis and in effect increases production of pheomelanin. The ASIP gene is thus a typical antagonist of the Mc1r receptor. Studies performed on variation within the ASIP strongly support earlier presumptions that this gene may affect human pigmentation. Some reports indicate significant correlation of one of its alleles with dark hair colour and brown eyes. Available results show that the homozygous state is a stronger determinant of these features. Scientists point to possible co-operation between genes ASIP and MC1R in the process of pigment production [29]. Researches carried out on identification of genes involved in pigmentation and determination of their role in these processes are certainly at the early stage. Medical knowledge concerning genetic susceptibility to diseases linked with pigment deficiency is relatively high. There is a need for detailed analysis of the genes described above in the context of natural variability of the human pigmentary phenotype. Further analysis of other genes, not mentioned in this work, which may be involved in determination of final phenotypic features is also necessary.

## 5. Link between pigmentation and identification of ethnic origin

Identification of ethnic origin is an important issue linked to studies on the pigmentary phenotype. This is because differences in pigmentary phenotype are very strong between individuals of various ethnic origins. Natural selection and probably sexual selection had a significant role in the evolution of pigmentation in humans, therefore variation within pigment related genes between different populations is higher than variation in other genes [43]. It is now beyond reasonable doubt that identification of particular genetic variants within pigment related genes may be a reliable source of information about ethnic origins [19, 65].

Polymorphisms within pigment related genes demonstrate large differences in frequency distribution between various populations and thus are considered as good markers for identification of ethnic origin [56, 57]. Wide research conducted on identification of reliable genetic markers for determination of ethnic origin has shown that as much as 80% of SNP polymorphisms within pigment related genes is useful for prediction of ethnic origins and population substructure. The same studies indicate that merely 20% of such polymorphisms in genes involved in other metabolic processes reveal such usefulness [19].

Differences in skin colour characteristic of people from various geographic regions have a relatively simple evolutionary explanation. It is assumed, as was mentioned above, that pigment variation is under evolutionary selective pressure. Individuals with darker skin colour are favoured in regions where the amount of solar radiation (including UV radiation) is exceptionally high. In fact, the phenomenon known as purifying selection has been demonstrated for the MC1R gene in one study [24]. Mutations in the MC1R receptor which lead to lighter skin colour are deleterious when they affect people living in geographical regions rich in UV irradiation. Careful examination of population data available for population samples of different ethnic origins reveals that higher variation within the MC1R gene is characteristic for European populations. This variation is significantly lower in population samples from Asia and is practically absent in the case of population samples from Africa [24, 25]. This variation pattern is exactly opposite to the polymorphism characteristic for the control region of mitochondrial DNA [28]. However, this latter portion of DNA is a non-coding DNA sequence and it is known that natural selection does not affect such regions in the course of molecular evolution. There is also an interesting hypothesis concerning the evolutionary processes of the pigmentary phenotype in human populations from geographic areas with low penetration of sun rays, such as the British Isles. This hypothesis assumes that lighter skin type may be an advantage in such regions because of the problem of rickets. However, it has not been confirmed so far by genetic data. Prediction of physical appearance on the basis of DNA analysis is more complicated than inference about ethnic origin by genetic tests. Its application must be preceded by detailed research and accumulation of data about the effect of particular mutations, gene variants and finally the combined effect of many genes on the ultimate phenotype picture. It seems that this issue is worth studying and the obtained results may have a future application in forensic genetics.

## 6. Summary

The development of new DNA technologies as well as increasing knowledge on the influence of particular mutations on phenotype have opened up new opportunities for further research, which should enable practical application of the data in the field of forensic genetics. It seems that studies on genetic determination of traits that are very distinct such as pigmentary phenotype are exceptionally useful for this purpose. Studies on genes and their associations with phenotypic features are inseparably linked with ethical issues. If application of such knowledge to forensic science is being considered, then the issue becomes particularly sensitive. It should be remembered that the debates which were conducted in various countries on the issue of preparation of national DNA databases involved not only lawyers, representatives of the police and forensic geneticists, but also politicians, ethicists and organisations concerned with the protection of the liberty of the individual. Voices of objection were raised concerning storage of DNA data, pointing out threats connected with violation of civic liberties, possibilities of manipulation and unjustified access to information about health conditions of registered persons. These arguments were countered by the argument (amongst others) that forensic science explores portions of DNA which contain no information about any human features [68]. However, currently, new opportunities for analysis of human features are emerging and analysis of coding portions of DNA may, (in addition to providing forensically useful information) potentially reveal medical information, e.g. increased risk of cancer development [64, 67]. A prepared scientific report (on coding portions of DNA) may be a significant help to Police, enabling them to increase the precision of their search for the real perpetrators. Thus, examination of physical features may be very beneficial at the level of investigation. It seems that the community of forensic geneticists is increasingly willing to accept analysis of DNA coding regions for prediction of ethnic origins and (in the more distant future) prediction of phenotype as well [11, 58]. For some experts, the significant benefits associated with genetic prediction of phenotypic features are becoming more obvious [6]. As was mentioned before, a common procedure of searching for a perpetrator in the absence of immediate suspects is DNA screening performed on individuals living in the area where the crime has been committed. It has been pointed out that in many such cases innocent people are unnecessarily caused worry. They very often have no connection with the case and do not even belong to the same ethnic

group as the perpetrator. Using genetics to establish that a criminal originates from a particular ethnic group or may have particular physical features should enable more accurate police action. This would be economically advantageous (limitation of the number of screened samples) as well as minimising the number of people unnecessarily caused worry by the justice system [58]. There are also arguments raised against the opinions presented by geneticists in the above cited article: ethicists point out that the gap between genetic prediction of ethnic origins and description of physical traits by genetic testing is still enormous, and that – following on from this – operating on the basis of incomplete knowledge may lead to a high number of errors [58]. The only conclusion that can be drawn from this dispute is that examination of coding regions for forensic purposes should not be rejected, but the methodologies applied to forensic science must be reliable and therefore their practical use should be preceded by detailed study.

## References

1. Akey J. M., Wang H., Xiong M. [et al.], Interaction between the melanocortin-1 receptor and P genes contributes to inter-individual variation in skin pigmentation phenotypes in a Tibetan population, *Human Genetics* 2001, 108, 516–520.
2. Arango V., Huang Y. Y., Underwood M. D. [et al.], Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior, *Journal of Psychological Research* 2003, 37, 375–386.
3. Bar W., Brinkmann B., Budowle B. [et al.], recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems, International Society for Forensic Haemogenetics, *International Journal of Legal Medicine* 1997, 110, 175–176.
4. Barsh G. S., What controls variation in human skin color?, *Public Library of Science – Biology* 2003, 1, E27.
5. Bell P. A., Chaturvedi S., Gelfand C. A. [et al.], SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery, *Biotechniques* 2002, 74, 76–77.
6. Benecke M., Coding or non-coding, that is the question: having solved the last technical hurdles to extract DNA information from virtually any biological material, forensic biologists now have to ponder the ethical and social questions of using information from exonic DNA, *The European Molecular Biology Organisation Reports* 2002, 3, 498–502.
7. Branicki W., Kupiec T., Wolańska-Nowak P. [et al.], Determination of forensically relevant SNPs in the MC1R gene, *Journal of Forensic Sciences* [in press].
8. Bodmer W. F., Cavalli-Sforza L. L., Genetics, evolution and man, W. H. Freeman, San Francisco 1976.
9. Brudnik U., Wojas-Pelc A., Branicki W., Genetyczne uwarunkowania czerniaka, *Postępy Dermatologii i Alergologii* 2006, 23, 21–25.
10. Brunner H. G., Nelen M., Breakefield X. O. [et al.], Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A, *Science* 1993, 262, 578–580.
11. Budowle B., SNP typing strategies, *Forensic Science International* 2004, 146, S139–S142.
12. Cargill E. J., Famula T. R., Schnabel R. D. [et al.], The color of a Dalmatian's spots: linkage evidence to support the TYRP1 gene, *Biomed Central Veterinary Research* 2005, 1, 1.
13. Carracedo A., Bar W., Lincoln P. [et al.], DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing, *Forensic Science International* 2000, 110, 79–85.
14. Corte-Real F., Forensic DNA databases, *Forensic Science International* 2004, 146, S143–S144.
15. Dettlaff-Kąkol A., Pawłowski R., First Polish DNA “man-hunt” – an application of Y-chromosome STRs, *International Journal of Legal Medicine* 2002, 116, 289–291.
16. Dixon L. A., Murray C. M., Archer E. J. [et al.], Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purposes, *Forensic Science International* 2005, 154, 62–77.
17. Duffy D. L., Box N. F., Chen W. [et al.], Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotype, *Human Molecular Genetics* 2004, 13, 447–461.
18. Frudakis T., Thomas M., Gaskin Z. [et al.], Sequences associated with human iris pigmentation, *Genetics* 2003, 165, 2071–2083.
19. Frudakis T., Venkateswarlu K., Thomas M. J. [et al.], A classifier for the SNP-based inference of ancestry, *Journal of Forensic Sciences* 2003, 48, 771–782.
20. Gill P., An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes, *International Journal of Legal Medicine* 2001, 114, 204–210.
21. Gill P., Werrett D. J., Budowle B. [et al.], An assessment of whether SNPs will replace STRs in national DNA databases – joint considerations of the DNA working group of the European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGAM), *Science and Justice* 2004, 44, 51–53.
22. Graf J., Hodgson R., van Daal A., Single nucleotide polymorphisms in the MATP gene are associated with normal human pigmentation variation, *Human Mutation* 2005, 25, 278–284.
23. Grimes E. A., Noake P. J., Dixon L. [et al.], Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype, *Forensic Science International* 2001, 122, 124–129.
24. Harding R. M., Healy E., Ray A. J. [et al.], Evidence for variable selective pressures at MC1, *American Journal of Human Genetics* 2000, 66, 1351–1361.
25. Hayward N. K., Genetics of melanoma predisposition, *Oncogene* 2003, 22, 3053–3062.

26. Jiang Y., Wilk J. B., Borecki I. [et al.], Common variants in the 5' region of the leptin gene are associated with body mass index in men from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study, *American Journal of Human Genetics* 2004, 75, 220–230.
27. Johnson R., Jackson I. J., Light is a dominant mouse mutation resulting in premature cell death, *Nature Genetics* 1992, 1, 226–229.
28. Jorde L. B., Bamshad M., Rogers A. R., Using mitochondrial and nuclear DNA markers to reconstruct human evolution, *Bioessays* 1998, 20, 126–136.
29. Kanetsky P. A., Swoyer J., Panossian S. [et al.], A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation, *American Journal of Human Genetics* 2002, 70, 770–775.
30. Kanetsky P. A., Ge F., Najarian D. [et al.], Assessment of polymorphic variants in the melanocortin-1 receptor gene with cutaneous pigmentation using an evolutionary approach, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2004, 13, 808–819.
31. King R. A., Willaert R. K., Schmidt R. M. [et al.], MC1R mutations modify the classic phenotype of oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), *American Journal of Human Genetics* 2003, 73, 638–645.
32. Koppula S. V., Robbins L. S., Lu D. [et al.], Identification of common polymorphisms in the coding sequence of the human MSH receptor (MC1R) with possible biological effects, *Human Mutation* 1997, 9, 30–36.
33. Krude H., Biebermann H., Luck W. [et al.], Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans, *Nature Genetics* 1998, 19, 155–157.
34. Krude H., Biebermann H., Gruters A., Mutations in the human proopiomelanocortin gene, *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003, 994, 233–239.
35. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. [et al.], Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 2001, 409, 860–921.
36. Lee S. T., Nicholls R. D., Jong M. T. [et al.], Organization and sequence of the human P gene and identification of a new family of transport proteins, *Genomics* 1995, 26, 354–363.
37. Lyons L. A., Foe I. T., Rah H. C. [et al.], Chocolate coated cats: TYRP1 mutations for brown color in domestic cats, *Mammalian Genome* 2005, 16, 356–366.
38. Linacre A., The UK National DNA Database, *Lancet* 2003, 361, 1841–1842.
39. Marchi E. Methods developed to identify victims of the world trade center disaster, *American Laboratory* 2004, 36, 30–36.
40. Martin-Guerrero I., Callado L. F., Saitua K. [et al.], The N251K functional polymorphism in the alpha(2A)-adrenoceptor gene is not associated with depression: a study in suicide completers, *Psychopharmacology* 2005, 7, 1–5.
41. Oetting W. S., King R. A., Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism, *Human Mutation* 1999, 13, 99–115.
42. Oetting W. S., Garrett S. S., Brott M. [et al.], P gene mutations associated with oculocutaneous albinism type II (OCA2), *Human Mutation* 2005, 25, 323–329.
43. Parra E. J., Kittles R. A., Shriver M. D., Implications of correlations between skin color and genetic ancestry for biomedical research, *Nature Genetics* 2004, 36, S54–S60.
44. Pastorino L., Cusano R., Bruno W. [et al.], Novel MC1R variants in Ligurian melanoma patients and controls, *Human Mutation* 2004, 24, 103–111.
45. Rana B. K., Hewett-Emmett D., Jin L. [et al.], High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus, *Genetics* 1999, 151, 1547–1557.
46. Ranadive N. S., Shirwadkar S., Persad S. [et al.], Effects of melanin-induced free radicals on the isolated rat peritoneal mast cells, *Journal of Investigative Dermatology* 1986, 86, 303–307.
47. Rebbeck T. R., Kanetsky P. A., Walker A. H. [et al.], P gene as an inherited biomarker of human eye color, *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention* 2002, 11, 782–784.
48. Rebbeck T. R., Spitz M., Wu X., Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies, *Nature Reviews Genetics* 2004, 5, 589–597.
49. Rees J. L., Genetics of hair and skin color, *Annual Review of Genetics* 2003, 37, 67–90.
50. Rees J. L., The genetics of sun sensitivity in human, *American Journal of Human Genetics* 2004, 75, 739–751.
51. Retz W., Retz-Junginger P., Supprian T. [et al.], Association of serotonin transporter promoter gene polymorphism with violence: relation with personality disorders, impulsivity, and childhood ADHD psychopathology, *Behavioral Sciences & The Law* 2004, 22, 415–425.
52. Rothstein M., Genetic justice, *New England Journal of Medicine* 2005, 352, 2667–2668.
53. Rouzaud F., Kadekaro A. L., Abdel-Malek Z. A. [et al.], MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation, *Mutation Research* 2005, 571, 133–152.
54. Rundshagen U., Zuhlke C., Opitz S., Mutations in the MATP gene in five German patients affected by oculocutaneous albinism type 4, *Human Mutation* 2004, 23, 106–110.
55. Schousboe K., Visscher P. M., Erbas B. [et al.], Twin study of genetic and environmental influences on adult body size, shape, and composition, *The International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2004, 28, 39–48.
56. Shriver M. D., Parra E. J., Dios S. [et al.], Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping, *Human Genetics* 2003, 112, 387–399.
57. Shriver M. D., Kennedy G. C., Parra E. J. [et al.], The genomic distribution of population substructure in four populations using 8,525 autosomal SNPs, *Human Genomics* 2004, 1, 274–286.
58. Shriver M., Frudakis T., Budowle B., Getting the science and the ethics right in forensic genetics, *Nature Genetics* 2005, 37, 449–450.



59. Sluyter F., Keijsers J. N., Boomsma D. I. [et al.], Genetics of testosterone and the aggression-hostility-anger (AHA) syndrome: a study of middle-aged male twins, *Twin Research* 2000, 3, 266–276.
60. Smith R., Healy E., Siddiqui S. [et al.], Melanocortin 1 receptor variants in an Irish population, *Journal of Investigative Dermatology* 1998, 111, 119–122.
61. Stephens M., Smith N. J., Donnelly P., A new statistical method for haplotype reconstruction from population data, *American Journal of Human Genetics* 2001, 68, 978–989.
62. Sturm R. A., O’Sullivan B. J., Box N. F. [et al.], Chromosomal structure of the human TYRP1 and TYRP2 loci and comparison of the tyrosinase-related protein gene family, *Genomics* 1995, 29, 24–34.
63. Sturm R. A., Duffy D. L., Box N. F. [et al.], Genetic association and cellular function of MC1R variant alleles in human pigmentation, *Annals of the New York Academy Sciences* 2003, 994, 348–358.
64. Sturm R. A., Duffy D. L., Box N. F. [et al.], The role of melanocortin-1 receptor polymorphism in skin cancer risk phenotypes, *Pigment Cell Research* 2003, 16, 266–272.
65. Sturm R. A., Frudakis T. N., Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry, *Trends in Genetics* 2004, 20, 327–332.
66. Valverde P., Healy E., Jackson I. [et al.], Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans, *Nature Genetics* 1995, 11, 328–330.
67. Valverde P., Healy E., Sikkink S. [et al.], The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with melanoma, *Human Molecular Genetics* 1996, 5, 1663–1666.
68. Wolańska-Nowak P., Branicki W., Baza danych profili DNA – nowe narzędzie dla wymiaru sprawiedliwości, *Prokuratura i Prawo* 2000, 5, 87–98.
69. Zhu G., Evans D. M., Duffy D. L. [et al.], A genome scan for eye color in 502 twin families: most variation is due to a QTL on chromosome 15q, *Twin Research* 2004, 7, 197–210.

---

**Corresponding author**

Wojciech Branicki  
Instytut Ekspertyz Sądowych  
ul. Westerplatte 9  
PL 31-033 Kraków  
e-mail: wbranicki@ies.krakow.pl

---

## ZASTOSOWANIE GENETYCZNEJ IDENTYFIKACJI CECH PIGMENTOWYCH W BADANIACH SĄDOWYCH

### 1. Wprowadzenie

Współczesna genetyka sądowa wypracowała skuteczne i wiarygodne metody identyfikacji człowieka poprzez analizę DNA. Stosowane testy polegają na analizie sekwencji DNA o wysokiej zmienności, przede wszystkim sekwencji mikrosatelitarnych DNA jądrowego, jak również polimorficznych sekwencji regionu kontrolnego DNA mitochondrialnego [3, 13]. Znaczny postęp technologiczny, jaki nastąpił w ostatniej dekadzie w tej dyscyplinie, doprowadził do wypracowania procedur badawczych umożliwiających analizę praktycznie każdego rodzaju materiału biologicznego. Osiągnięto maksymalną możliwą czułość prowadzonych badań, dzięki czemu realna stała się analiza śladów zawierających znikome ilości DNA lub narażonych na szczególnie silne procesy gnilne. Siła dyskryminacji uzyskiwana w oparciu o analizę markerów typu STR (ang. short tandem repeats) osiąga bardzo wysokie wartości, co decyduje o dużym znaczeniu dowodu z analizy genetycznej. Trudno przecenić znaczenie, jakie dla współczesnego wymiaru sprawiedliwości ma dowód z badania DNA. Znane są sprawy sądowe, w których przed laty wydano fałszywe wyroki w oparciu o subiektywne dowody, jak np. rozpoznanie dokonane przez ofiarę bądź świadka zdarzenia. Dziś po ponownej ocenie materiału dowodowego i analizie dowodów biologicznych osoby niesłusznie odsiadujące wyroki sądowe zostały uniewinnione [52]. Wysoce wiarygodny dowód, jaki dostarczany jest dzięki technologii analizy DNA, pozwala na kategoryczne wykluczenie ich związku z przestępstwami. Ogromnym sukcesem wymiaru sprawiedliwości okazała się również, zainicjowana w Wielkiej Brytanii, idea tworzenia narodowych rejestrów profili DNA [14, 38]. Rejestry takie z powodzeniem służą wymiarowi sprawiedliwości w większości rozwiniętych państw świata. Na obecnym etapie rozwoju genetyki sądowej warto zastanowić się nad dalszymi perspektywami tej dyscypliny naukowej.

### 2. Zmienność pojedynczych nukleotydów

W polu szczególnego zainteresowania genetyków sądowych znalazł się alternatywny wobec sekwencji typu STR rodzaj zmienności genetycznej, tzw. polimorfizmy pojedynczego nukleotydu – SNP (ang. single nucleotide polymorphisms). Prace prowadzone nad uzyskaniem kompletnej sekwencji DNA genomu człowieka pozwoliły na identyfikację ponad 1,5 miliona pojedynczych nukleotydów polimorficznych typu SNP [35]. Stanowią

one podstawowy i najbardziej powszechny rodzaj zmienności genetycznej. Definicja zmienności pojedynczego nukleotydu zakłada jednocentową częstość rzadszego wariantu, co pozwala na wyeliminowanie rzadkich mutacji punktowych. Jak się szacuje, pojedyncze polimorficzne nukleotydy występują w genomie człowieka z częstością 1 na 200–300 par zasad [61].

Dotychczas genetycy sądowi najwięcej uwagi poświęcili pozycjom typu SNP zlokalizowanym w regionach niekodujących, upatrując w nich zmienności, która mogłaby w przyszłości zastąpić standardową obecnie analizę układów typu STR. Szeroko omówiono wady i zalety takiej zmiany technologii. Możliwość jeszcze większej automatyzacji procesu analizy, miniaturyzacji sprzętu niezbędnego do przeprowadzenia badań, zapewnienia maksymalnej czułości testów (długość analizowanych fragmentów DNA może wynosić mniej niż 100 par zasad) występujące po stronie zalet, równoważone są przez dosyć istotne ujemne aspekty związane ze zmianą metod badawczych. Po stronie wad z pewnością zapisac należy znaczne koszty takiej operacji (duże pieniądze zainwestowano w rejestry profili DNA prowadzone w oparciu o technologię STR), trudne do rozwiązania problemy związane z analizą mieszanin materiału genetycznego, konieczność analizy najmniej 50–100 *loci* zamiast 10–16 analizowanych obecnie i kłopoty z ustaleniem standardowego zestawu pozycji nukleotydowych pozwalającego na osiągnięcie równie wysokiej siły dyskryminacji dla populacji z różnych grup etnicznych [20, 57]. W dokumencie wydanym w tej sprawie przez organizację zrzeszającą instytuty ekspertyz sądowych ENFSI (ang. European Network of Forensic Science Institutes) stwierdzono, że w najbliższej przyszłości nie przewiduje się rezygnacji z analizy układów typu STR na rzecz zmienności typu SNP [21]. Mimo to badania w tym kierunku trwają i powstają kolejne zestawy do badań identyfikacyjnych wykorzystujących zmienność pojedynczych nukleotydów, które przeznaczone są przede wszystkim do analizy materiału o wyjątkowo dużym stopniu degradacji [16, 39]. Wydaje się, że zmienność typu SNP może w przyszłości dać dodatkowy panel polimorfizmów, których analiza w celach identyfikacyjnych będzie użyteczna w niektórych okolicznościach.

Większość opisanych powyżej ograniczeń nie stanowi przeszkody do zastosowania technologii analizy SNP w sprawach dotyczących spornego ojcostwa. Prawdziwy przełom może być związany z badaniem polimorfizmów typu SNP analizowanych nie w kontekście identyfikacyjnym, lecz w celu określenia cech osoby sta-

nowiącej źródło próbki DNA. Środowisko genetyków sądowych przyzwyczajone jest do tego, że analizowane sekwencje DNA stanowią tzw. DNA niekodujący, w związku z czym nie są identyfikowane żadne cechy fenotypowe właściciela próbki. Jedyne wyjątkiem stanowi powszechnie analizowany marker amelogeniny umożliwiający identyfikację płci osobnika. Jak wiadomo, opis sprawcy dokonywany przez świadków zdarzenia ma często istotne znaczenie z punktu widzenia prowadzonego dochodzenia. W wielu przypadkach nie ma jednak świadków, co często utrudnia wytypowanie podejrzanych w sprawie i w efekcie wydłuża prowadzone dochodzenie lub nawet zawiesza go w martwym punkcie. Pozostawione na miejscu zdarzenia ślady biologiczne pozwalają wprawdzie na uzyskanie profilu genetycznego sprawcy, jest on jednak mało użyteczny wobec braku materiału porównawczego. W takich przypadkach niejednokrotnie konieczne było prowadzenie bardzo szerokich badań, w które włączano materiał porównawczy pobierany od mieszkańców zamieszkujących okolicę, w której dokonano przestępstwa [15]. Zawężenie kręgu podejrzanych, które mogłyby mieć zasadnicze znaczenie dla obniżenia kosztów prowadzonego postępowania, a przede wszystkim dla szybkiego ujęcia sprawców, ogranicza się do typowania psychologicznego. W przypadku gwałtów polega ono jednak zazwyczaj tylko na badaniu próbek pochodzących od mężczyzn w określonym przedziale wiekowym. Jak wspomniano we wprowadzeniu, opis sprawcy przestępstwa przedstawiany przez ofiarę lub świadka zdarzenia nie zawsze jest wiarygodny. Genetyczne potwierdzenie zeznań świadków może zatem stanowić bardzo użyteczne narzędzie pozwalające na uniknięcie błędów w prowadzonym dochodzeniu.

### 3. Badania SNP w regionach kodujących

Dzięki ogromnemu postępowi w badaniach nad genomem człowieka idea opisu cech sprawcy przestępstwa na podstawie analizy śladu biologicznego pozostawionego na miejscu zdarzenia zaczyna nabierać realnych kształtów. Większość z polimorficznych pozycji nukleotydowych zlokalizowana jest w regionach niekodujących. Szacuje się jednak, że co najmniej 100 000 zlokalizowana jest wewnątrz genów. Niesynonimiczne zmiany sekwencji DNA genów w efekcie odpowiadają za polimorfizm w łańcuchu aminokwasowym białek, prowadząc do zmian w funkcjonowaniu białkowego produktu, a w efekcie do różnic fenotypowych charakteryzujących poszczególnych osobników. Istotne znaczenie dla różnicowania fenotypowego mają również zmiany nukleotydów znajdujących się w regionach promotorowych i regulatorowych genów, które mogą wpływać na poziom ekspresji genu i stabilność transkrypty. Badania prowadzone nad powiązaniem między genami a cechami

osobniczymi przede wszystkim koncentrują się na problemie predyspozycji do chorób wynikających z posiadanego wariantu genetycznego oraz na różnicach w odpowiedzi na leki obserwowanych u pacjentów [5, 48]. Poszczególne warianty genetyczne niezaprzeczalnie związane są również z naturalnymi różnicami fenotypowymi istniejącymi w populacji ludzkiej pod względem wielu różnych cech fizycznych. Ustalenie tego typu cech osobniczych na podstawie analizy DNA śladu biologicznego mogłoby wnieść istotne dane dla organów śledczych prowadzących dochodzenie oraz zawęzić krąg podejrzanych czy skierować dochodzenie w określonym kierunku. Badania te stanowiłyby zatem rodzaj informacji o charakterze operacyjnym, użytecznej w trakcie prowadzonego dochodzenia i nie byłyby wykorzystywane do przygotowania typowej opinii sądowej [J. Wójcikiewicz – rozmowa indywidualna]. Identyfikacja cech fizycznych poprzez analizę DNA może okazać się również istotnym uzupełnieniem badań antropologicznych polegających na rekonstrukcji wyglądu fizycznego osoby na podstawie analizy jej szczątków, i jak się wydaje, ten aspekt wymagałby wydania klasycznej opinii. Istotny problem związany z genetyczną determinacją cech związany jest z ich wielogenowym dziedziczeniem i różnym wpływie czynników środowiskowych na ostateczny obraz fenotypowy.

W ocenie roli czynnika genetycznego i środowiskowego na fenotyp nieocenione są badania prowadzone w tym kontekście nad bliźniakami jednojajowymi [55, 59, 63]. Obecny poziom wiedzy umożliwia prowadzenie badań nawet nad złożonymi cechami fizycznymi o dziedziczeniu ilościowym, których analiza może w przyszłości znaleźć zastosowanie w genetyce sądowej. W opisie sprawcy przestępstwa z pewnością istotne znaczenie ma zdefiniowanie budowy ciała, a więc genetyczna identyfikacja wzrostu czy wagi osobnika, który pozostawił ślady na miejscu zdarzenia, wydaje się jak najbardziej celowa [55]. Pojawiają się wprawdzie prace, które opisują związki niektórych alleli w genach takich, jak LEP (ang. leptin OMIM 164160) z patologiczną otyłością, ale wnioski te wymagają dalszych badań, więc przedwczesne byłoby rozważanie praktycznego zastosowania tych danych [26]. Badania wskazują, że również inne cechy mają w dużym stopniu podłoże genetyczne i w przyszłości będziemy mogli na podstawie analizy DNA przewidywać bardziej subtelne różnice charakterystyczne dla gatunku człowieka, jak kształt czaszki, budowa nosa, kształt uszu, lewoczy praworęczność. W literaturze przedmiotu odnaleźć można również doniesienia na temat związków pomiędzy określonymi wariantami genetycznymi a skłonnością do zachowań agresywnych czy depresji [2, 10, 40, 51]. Technicznie łatwiejsza i budząca mniej kontrowersji natury etycznej wydaje się analiza cech fizycznych. Ich genetyczna determinacja jest nie do podważenia, a wpływ czynników środowiskowych zaniedbywalny, czego do-

wodem są, tożsame genetycznie, bliźniaki jednojajowe. Poziom podstawowej wiedzy na temat genów kontrolujących cechy fizyczne jest znaczący w przypadku pigmentacji człowieka.

#### 4. Fenotyp pigmentowy człowieka

W ostatnich latach nastąpił szczególnie wyraźny postęp w badaniach podstawowych prowadzonych nad związkami pomiędzy genetyką a fenotypem pigmentowym, co otwiera szansę na praktyczne zastosowanie zgromadzonej wiedzy we względnie niedalekiej przyszłości, między innymi w naukach sądowych. Dane dotyczące koloru skóry, włosów i oczu wydają się bardzo istotne z punktu widzenia opisu sprawcy przestępstwa czy też osoby zaginionej, gdyż zmienność charakteryzująca fenotyp pigmentowy stanowi bez wątpienia jedną z najbardziej wyrazistych cech polimorficznych. Zagadnienia związane z pigmentacją są z pewnością interesujące dla naukowców reprezentujących różne dyscypliny naukowe w związku z mechanizmami dziedziczenia i ewolucją organizmów, badaniami filogeograficznymi i migracją ludności, problemem substruktury populacji, a także związkami pomiędzy intensywnością pigmentacji a podatnością na nowotwory [8, 9, 25, 43, 56].

Łatwa do zaobserwowania zmienność w fenotypie barwnikowym istniejąca w populacji ludzkiej jest przede wszystkim związana z różnicami w zawartości melaniny. Decydujące znaczenie ma jej ilość, typ oraz rozmieszczenie. Melanina jest polimerem syntetyzowanym z pochodnych tyrozyny w specyficznych komórkach zwanych melanocytami. Komórki te znaleźć można w skórze, mieszkach włosowych, tęczówce oraz nabłonku oka. Znane są dwa typy melaniny, czerwono-żółta zwana feomelaniną oraz czarno-brązowa zwana eumelaniną. Zdecydowany nadmiar feomelaniny ujawnia się w postaci charakterystycznego fenotypu barwnikowego – osoby takie mają jasną skórę, często z licznymi piegami oraz rude włosy. Przewaga eumelaniny manifestuje się poprzez ciemne włosy, oliwkową skórę oraz zwykle brązowe oczy. Produkowany pigment gromadzony jest w melanosomach, które następnie przekazywane są do keratynocytów. Przyjmuje się, że w determinację fenotypu pigmentowego zaangażowanych jest ponad 120 genów [41, 53]. Dotychczas poznano kilka genów mających istotny wpływ na zawartość melaniny w organizmie człowieka. Zmienność genetyczna w obrębie tych genów może w efekcie powodować zróżnicowanie fenotypowe charakterystyczne dla naszego gatunku. Jak dotąd, gruntownie poznano wpływ polimorfizmu na naturalną zmienność fenotypu człowieka w jednym z tych genów, który odpowiedzialny jest za kodowanie receptora dla melanokortyny typu 1 (MC1R). Receptor MC1R związany jest z błoną komórkową melanocytów, w których,

jak wspomniano wcześniej, ma miejsce synteza melaniny. Jego aktywacja, która odbywa się poprzez hormon -MSH (ang. melanocyte stimulating hormone), prowadzi do wzrostu syntezy eumelaniny przy jednoczesnym obniżeniu syntezy feomelaniny [4]. Gen receptora MC1R składa się z jednego, krótkiego fragmentu DNA o długości 951 pz, a więc analiza sekwencji całego genu nie sprawia szczególnych kłopotów technicznych. Badania genetyczne wykazały, iż posiadany wariant genu receptora MC1R ma istotny wpływ na posiadany typ skóry oraz kolor włosów. Dzięki szerokim badaniom populacyjnym, na świecie zidentyfikowano kilkadziesiąt różnych alleli genu MC1R [30, 49, 63]. Dane zawarte w literaturze przedmiotu wskazują na kilka z nich jako na warianty związane z fenotypem barwnikowym charakteryzującym się rudym kolorem włosów i jasną skórą. Osoby o takich cechach wykazują podwyższoną wrażliwość na działanie promieni UV, łatwo doznając poparzeń słonecznych. Taki fenotyp pigmentowy jest wywołany nadmiarem feomelaniny względem eumelaniny, a jak wykazano, eumelanina ma silne właściwości fotoochronne, podczas gdy feomelanina przy działaniu promieni UV sprzyja powstawaniu wolnych rodników [46]. Autorzy większości publikacji są zgodni, że mutacje C451T, C478T i G880A posiadają kluczowe znaczenie w powstawaniu takiego fenotypu barwnikowego [50, 66]. Odsetek osobników charakteryzujących się rudymi włosami i posiadających wariant z dwiema powyższymi mutacjami wynosi dla populacji brytyjskiej ok. 96% [23]. Dane uzyskane dla populacji polskiej pokazują, że wartość ta może sięgnąć nawet 98%. Badania, którymi objęto populację polskich osobników o rudych włosach, potwierdzają znaczącą rolę powyższych mutacji, a także pokazują, iż kilka innych wariantów genu MC1R silnie predysponuje do posiadania rudego koloru włosów [7]. Badania dowiodły, że wykazanie niektórych wariantów genu MC1R w nieznanej próbce może być użyteczne w celu przewidywania fenotypu pigmentowego osoby stanowiącej jej źródło. Osobnicy heterozygotyczni posiadający jeden niezmutowany allel mogą posiadać rudawy odcień włosów, a u mężczyzny taki układ genetyczny może ujawniać się w postaci rudego zarostu. Gen MC1R nie wyczerpuje zagadnienia dziedziczenia rudego koloru włosów, co więcej, w populacjach charakteryzujących się ciemniejszą skórą nawet posiadanie dwóch zmutowanych alleli genu MC1R niekoniecznie determinuje ten kolor włosów [44]. Trudności z jednoznaczną genetyczną identyfikacją rudego koloru włosów związane są z udziałem innych genów w dziedziczeniu fenotypu barwnikowego. Genem, który również powiązано z rudym kolorem włosów, jest POMC (OMIM 176830), prekursor receptora -MSH, agonisty receptora MC1R [33]. Jego rola w determinacji rudego koloru włosów jest jednak minimalna. Częściej odnaleźć można korelacje wariantów tego genu z zaburzeniami metabolizmu, otyłością oraz innymi nieprawi-

dłowościami [34]. Wciąż nie do końca wyjaśniony pozostaje wpływ mutacji występujących w genie MC1R na posiadany kolor oczu. Niektóre badania wykazały związek pojedynczych mutacji tego genu z niebieskim kolorem oczu [32, 67]. Inne badania nie wykazały żadnych związków wariantów tego genu z kolorem oczu [np. 60]. W niedawno opublikowanej pracy Frudakis i in. zanotowali związek, ale nie pojedynczych mutacji, lecz haplotypów MC1R i nie z niebieskim, a z zielonym kolorem oczu [18].

Dane dostępne dla innych genów związanych z pigmentacją człowieka dotyczą przede wszystkim stanów patologicznych, przy czym niewiele wiadomo na temat ich wpływu na naturalną zmienność pigmentową człowieka. Defekt jednego z genów może prowadzić do zakłócenia funkcji istotnego szlaku metabolicznego i w konsekwencji stanu chorobowego, np. albinizmu, podczas gdy efekt koloru oczu wynika z współdziałania wielu genów. Znane są cztery różne typy albinizmu, a każdy z nich związany jest z mutacjami w innym genie. Wydaje się jednak i potwierdzone jest to kolejnymi doniesieniami, że te same geny, które wywołują patologiczne stany w pigmentacji człowieka, decydują również o naturalnej zmienności istniejącej w populacji w kolorze oczu, włosów oraz skóry. Proces utleniania tyrozyny, kluczowy etap w syntezie zarówno eumelaniny, jak i feomelaniny, jest kontrolowany przez enzym oksydatywny – tyrozinazę – TYR (OMIM 606933). Gen tyrozinazy jest bardziej skomplikowany niż omawiany poprzednio MC1R. Składa się z 5 oddalonych od siebie fragmentów DNA, co technicznie komplikuje nieco jego analizę. Mutacje prowadzące do całkowitej dysfunkcji tego enzymu wywołują skrajny albinizm określony jako albinizm oczno-skrótny typu 1A. Znane są również mutacje w genie TYR, które prowadzą jedynie do obniżenia aktywności enzymu. Choroba ma wtedy łagodniejszy obraz i taki albinizm sklasyfikowano jako 1B [41]. W sumie opisano kilkadziesiąt mutacji w genie TYR, które wywołują albinizm. W literaturze przedmiotu nie ma jednak jak dotąd danych na temat związku zmienności w genie TYR z naturalnymi cechami pigmentacyjnymi. Ostatnie doniesienia naukowe wskazują, iż genem mającym istotne znaczenie modulujące działanie genu MC1R, jest gen OCA2 (ang. oculocutaneous albinism type 2, OMIM 203200). Produkt genu OCA2, białko związane z błoną melanosomów, ma istotny wpływ na stopień syntezy pigmentu. Gen składa się z aż 24 oddalonych od siebie fragmentów DNA zawartych na stosunkowo długim odcinku 267 tysięcy par zasad [36]. Gen koduje tzw. białko P zawierające 12 regionów transmembranowych, a więc białko wiążące się z błoną komórkową. Gen OCA2 jest wyjątkowo polimorficzny; sekwencjonowanie ludzkiego genomu wykazało w nim obecność ponad 200 polimorficznych pozycji nukleotydowych. Dotychczas jedynymi miejscami polimorficznymi, które jednoznacznie po-

wiązano z konkretnymi cechami, pozostają mutacje wywołujące albinizm typu 2 [42]. W przypadku tego genu wiedza na temat polimorfizmów skorelowanych z naturalną zmiennością w pigmentacji jest jednak nieco większa. Szeroko zakrojone badania nad bliźniakami jednojajowymi pokazały, że OCA2 odpowiedzialny jest za ponad 70% zmienności w kolorze oczu populacji ludzkiej [69]. Wcześniejsze badania również sugerowały związek genu OCA2 z kolorem oczu. Pokazano, iż dwie mutacje w fragmentach 9 oraz 13 tego genu istotnie predysponują do posiadania koloru oczu innego niż niebieskie [47]. Inny zespół naukowców wykazał z kolei 10 różnych pozycji typu SNP zlokalizowanych w genie OCA2, w przypadku których odnotowano bardzo istotne związki poszczególnych alleli z różnymi kolorami oczu [19]. W literaturze przedmiotu sugerowana jest zależność genów MC1R i OCA2 w tworzeniu ostatecznego fenotypu [1, 17, 31]. Grupa Frudakisa wykazała również, że niektóre warianty genu TYRP1 (ang. tyrosinase related protein 1, OMIM 115501) wykazują silne związki z kolorem tęczówki oka [19]. Wcześniej pojawiały się sugestie, że gen ten może mieć związki z przedwczesnym siwieniem [27]. Gen zlokalizowany jest na chromosomie 9p23 i złożony z 7 eksonów rozciągających się na odcinku 24 tysięcy par zasad [62]. Wpływ genu TYRP1 na naturalną zmienność pigmentacji wykazano również u zwierząt [12, 37]. Niektóre warianty tego genu są związane u ludzi z zaburzeniami pigmentacji, które sklasyfikowano jako albinizm typu 3. Poza OCA2 istotnym regulatorem wpływającym na zapewnienie odpowiedniej ilości substratów niezbędnych do produkcji melaniny oraz pozytywnie regulującym proces syntezy jest gen MATP (ang. membrane associated transporter protein, OMIM 606202). Ludzki gen MATP składa się z 7 fragmentów DNA. Budowa białka MATP wskazuje, iż jest to typowe białko transportujące. MATP jest związany z błoną melanosomów (podobnie jak OCA2 12-krotnie przechodzi przez błonę) i najprawdopodobniej jest zaangażowany w proces tworzenia melaniny. Opisano mutacje genu MATP, które wywołują typowy obraz fenotypowy albinizmu oczno-skrótnego podobny do albinizmu związanego ze zmutowanym białkiem P. Albinizm wywołany mutacjami w genie MATP nazwano albinizmem typu 4 i opisano w różnych populacjach, również w europejskiej [np. 54]. Ostatnio pojawiła się pierwsza praca, w której przedstawiono korelację mutacji genu MATP z naturalną pigmentacją u człowieka [22]. Doniesienia takie istnieją także dla myszy i wydaje się, że jest to gen, któremu genetycy powinni się przyjrzeć bliżej w kontekście jego związków z naturalną pigmentacją.

Gen ASIP (ang. agouti signaling protein, OMIM 600201) zawiera 4 fragmenty DNA kodujące białko, które, jak udowodniono, jest zaangażowane w proces syntezy melaniny. Wiążąc się z receptorem MC1R, uniemożliwia działanie hormonu  $\alpha$ -MSH, co prowadzi

do obniżenia produkcji eumelaniny, a w efekcie do pozytywnej regulacji syntezy feomelaniny. ASIP pełni zatem rolę antagonisty receptora MC1R. Istnieją silne przesłanki wynikające z badań nad polimorfizmem genu ASIP, które potwierdzają przypuszczenia o jego wpływie na fenotyp pigmentowy człowieka. Badania wykazały znaczący związek jednego z alleli z ciemnym kolorem włosów oraz brązowym kolorem oczu, przy czym dane pokazują, że układ homozygotyczny w większym stopniu predysponuje do posiadania powyższych cech.

Specjaliści zwracają uwagę na możliwość współdziałania genów ASIP i MC1R w procesie pigmentacji [29]. Badania związane z identyfikacją genów i ich rolą w pigmentacji człowieka z pewnością znajdują się w początkowej fazie. Wiedza medyczna dotycząca genetycznego podłoża chorób związanych z niedoborem pigmentu jest dosyć szeroka. Konieczna jest szczegółowa analiza powyższych genów w kontekście naturalnej zmienności fenotypu pigmentowego człowieka, jak również analiza innych, nieopisanych tutaj genów, które mogą być zaangażowane w kształtowanie ostatecznego fenotypu.

## 5. Pigmentacja a identyfikacja pochodzenia etnicznego

Istotnym aspektem badań nad fenotypem pigmentowym jest zagadnienie identyfikacji pochodzenia etnicznego. Różnice w fenotypie pigmentowym są szczególnie wyraźne w przypadku ludzi o różnym pochodzeniu etnicznym. W związku z tym, że znaczącą rolę w ewolucji pigmentacji odegrała selekcja naturalna i prawdopodobnie również dobór płciowy, zmienność w obrębie genów związanych z procesami pigmentacji pomiędzy różnymi populacjami jest wyższa niż zmienność w innych genach [43]. To, że identyfikacja odpowiednich wariantów genetycznych w obrębie genów pigmentacyjnych może być wiarygodnym źródłem informacji o pochodzeniu etnicznym, nie budzi już wątpliwości [19, 65]. Polimorfizmy w genach związanych z pigmentacją wykazują duże różnice w częstościach pomiędzy populacjami, w związku z czym znalazły się w panelu markerów genetycznych o istotnym znaczeniu z punktu widzenia identyfikacji pochodzenia etnicznego [56, 57]. Szerokie badania zmierzające do identyfikacji tego typu markerów wykazały, że aż 80% polimorfizmów typu SNP w genach zaangażowanych w procesy pigmentacji jest użyteczna w badaniach nad pochodzeniem etnicznym i substrukturą populacji, podczas gdy zaledwie 20% polimorfizmów w innego typu genach metabolicznych wykazuje taką użyteczność [19].

Różnice w kolorze skóry dla ludzi z różnych obszarów geograficznych mają dosyć proste uzasadnienie ewolucyjne. Wspomniano powyżej, iż przyjmuje się, że

zmienność w pigmentacji podlega ewolucyjnej presji selekcyjnej. Osobnicy o ciemnym kolorze skóry są preferowani na terenach, gdzie ilość promieniowania słonecznego, a w związku z tym również ultrafioletowego, jest szczególnie wysoka. Rzeczywiście, jedna z prac wykazała zjawisko selekcji czyszczącej (ang. purifying selection) w przypadku genu MC1R [24]. Mutacje w receptorze MC1R prowadzące do rozjaśnienia fenotypu pigmentowego są szkodliwe w tych regionach świata, gdzie poziom promieniowania ultrafioletowego jest szczególnie wysoki. Przyglądając się danym populacyjnym dla różnych prób etnicznych, można zauważyć, że najwyższa zmienność genu MC1R istnieje w populacjach europejskich, jest znacznie niższa w populacjach azjatyckich oraz praktycznie nie występuje w populacjach afrykańskich [24, 45]. Jest to sytuacja dokładnie przeciwna do tej, która występuje w przypadku sekwencji typu STR oraz regionu kontrolnego mitochondrialnego DNA [28]. Te ostatnie sekwencje są jednak sekwencjami niekodującymi, stąd ich ewolucja nie podlega presji doboru naturalnego. Ciekawa hipoteza na temat fenotypu pigmentowego ludzi z regionów o słabszej penetracji promieni słonecznych (np. Wyspy Brytyjskie) zakłada, że jasna skóra (osoby o rudym fenotypie) może być preferowana na tych terenach przez ewolucję w związku z problemem krzywicy. Nie znalazła ona jednak jak dotąd potwierdzenia w badaniach genetycznych. Przewidywanie wyglądu fizycznego poprzez analizę DNA jest zagadnieniem bardziej skomplikowanym niż genetyczne określanie pochodzenia etnicznego i wymaga zgromadzenia znacznej wiedzy na temat wpływu poszczególnych mutacji, wariantów genów i wreszcie sumarycznego działania wielu genów na ostateczny fenotyp. Wydaje się jednak, że warto podjąć tego typu badania, również w perspektywie zastosowania uzyskanych wyników w genetyce sądowej.

## 6. Podsumowanie

Rozwój nowoczesnych technologii analizy DNA oraz rosnący poziom wiedzy na temat wpływu poszczególnych mutacji na efekt fenotypowy pozwala na rozważenie możliwości podjęcia badań, które pozwoliłyby na przyszłe wykorzystanie zgromadzonych wiadomości w genetyce sądowej. Szczególnie użyteczne, w tym kontekście, wydają się badania nad genetyczną determinacją cech szczególnie wyrazistych, do jakich należy fenotyp pigmentowy. Zagadnieniem nieodłącznie związanym z genetyką i jej związkiem z cechami jest etyczny wymiar tego typu badań. Jest to kwestia szczególnie delikatna, jeśli zakładamy wykorzystanie takiej wiedzy w naukach sądowych. Pamiętamy, że w dyskusje, które towarzyszyły przygotowywaniu rejestrów profili DNA w poszczególnych państwach, zaangażowali się prawnicy,

przedstawiciele policji i genetycy sądowi, ale również politycy, etycy oraz organizacje dbające o wolności osobiste jednostki. Pojawiły się głosy sprzeciwu wobec praktyki gromadzenia danych dotyczących DNA, które wskazywały na zagrożenia związane z ograniczeniem swobód obywatelskich, możliwościami manipulacji oraz uzyskiwania informacji związanych np. ze zdrowiem osoby uwzględnianej w rejestrze. Zarzuty te zostały odparte między innymi dzięki argumentowi, iż analizie dla celów sądowych poddawane są sekwencje nieniosące żadnych informacji o jakichkolwiek cechach człowieka [68]. Obecnie otwiera się natomiast możliwość analizy cech ludzkich. Analizując sekwencje DNA kodującego, potencjalnie możemy mieć dostęp do wiedzy o charakterze medycznym, np. podwyższonym ryzyku zachorowania na niektóre nowotwory [64, 67]. Uzyskanie wiedzy o charakterze operacyjnym, dzięki której będzie znacznie bardziej precyzyjnie poszukiwać sprawców przestępstw, może jednak przynieść nieoceniszone korzyści. Wydaje się, że środowisko genetyków sądowych powoli oswaja się z myślą o wykorzystaniu regionów kodujących DNA do badań nad pochodzeniem etnicznym, a w dalszej kolejności również przewidywania fenotypu [11, 58]. Niektórzy zaczynają dostrzegać istotne korzyści, jakie mogą wynikać z genetycznej determinacji tego typu cech [6]. Jak napisano wcześniej, często wykorzystywanym sposobem poszukiwania sprawcy przestępstwa w sytuacji, gdy nie ma podejrzanych, jest analiza próbek DNA pobieranych od osób z okolicy, w której doszło do zdarzenia. Wskazuje się, że w takich wypadkach często niepotrzebnie niepokojeni są ludzie, którzy nie mieli żadnego związku ze sprawą i nie reprezentują nawet grupy etnicznej, z której pochodził sprawca przestępstwa. Genetyczne wykazanie, że napastnik pochodził z określonej grupy etnicznej lub posiadał określone cechy fizyczne, pozwoliłoby policji działać o wiele bardziej precyzyjnie, co przyniosłoby korzyści ekonomiczne (ograniczenie liczby testowanych próbek) oraz zminimalizowałoby grupę osób niepotrzebnie niepokojonych przez wymiar sprawiedliwości [58]. Podnoszą się oczywiście głosy polemiczne i w odpowiedzi na poglądy zaprezentowane w powyżej cytowanym artykule przygotowanym przez genetyków, etycy zauważają, że przepaść pomiędzy identyfikacją pochodzenia etnicznego a genetycznym opisem cech fizycznych jest wciąż ogromna, zaś operowanie niepełną wiedzą może spowodować szereg nieprawidłowości [58]. Jedyne wnioski, jakie można jednak wyciągnąć z tej polemiki, jest taki, że nie neguje się samego zastosowania regionów kodujących w badaniach sądowych, lecz wskazuje, że powinno ono zostać poprzedzone poprzez szczegółowe badania pozwalające na wiarygodne wprowadzenie tego typu metodologii do laboratoriów sądowych.