



## STUDIES ON PREDICTING PIGMENTATION PHENOTYPE FOR FORENSIC PURPOSES

Wojciech BRANICKI

*Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

### Abstract

Differences in pigmentation phenotype are mainly due to variation in the amount, type and distribution of melanin. This biopolymer pigment is synthesised in a complex biochemical process called melanogenesis, which takes place in specialised melanocyte structures known as melanosomes. Melanin is then stored in the melanosomes, which are further transported into keratinocytes, resulting in skin and hair coloration. These complicated cellular processes are thought to be controlled by more than 120 pigmentation genes. Studying their polymorphism may allow us to understand the genetic basis of observed human skin, hair and eye colour variation. A tiny fraction of these genes, e.g. *MC1R*, *OCA2*, *SLC45A2* and *ASIP*, has been the subject of more thorough examinations, while some others, such as *SLC24A4*, *KITLG* or *TPCN2*, have only been identified as potential contributors to the significant variation in human pigmentation phenotype and await more detailed research. Studies on genetics of pigmentation are important not only for medical purposes, but are of potential use in forensic science, as an analysis of variation in pigmentation genes may in the future allow prediction of phenotypic features that would be of special importance at the investigative level.

### Key words

Forensic genetics; Pigmentation; Association study; Pigmentation genes; Phenotype prediction.

*Received 13 February 2009, accepted 19 March 2009*

### 1. Introduction

Pigmentation traits are heritable and their variability is particularly pronounced in individuals of different biogeographical ancestry (BGA) [77]. BGA identification may be useful in criminal cases and thus the polymorphism of pigmentation genes has become the subject of investigations in forensic science [33, 112]. Another reason for such investigations is the possibility of using the polymorphism of pigmentation genes in predicting pigmentation phenotypes. Such studies would be predominantly useful in the case of European populations, with their considerable variability of skin, hair and eye colour. In cases where a witness is highly or completely unreliable in his/her testi-

mony regarding a perpetrator, phenotype prediction achieved through analysing biological material left by a perpetrator at the crime scene may narrow the particular suspect group, thus facilitating the task of investigative officers. Prediction of pigmentation phenotype might also be helpful in forensic anthropology. For many years now, genetic analysis of every sample subjected to standard identification tests in a forensic laboratory has been associated with determining the gender of the individual from which the said material originated. The results of this simple test reduce the population of individuals of interest to prosecution organs in particular cases by 50%. Determining further details of the perpetrator's phenotype would undoubtedly be very advantageous. However, the importance

of reliability of information conveyed to investigative institutions should be emphasized, since misleading prosecution organs may additionally hinder the investigation. Any practical application of knowledge allowing prediction of phenotype features has, therefore, to be preceded by detailed association, functional and validative studies [84].

## 2. Determination of human pigmentation traits

### 2.1. Physical determination of pigmentation traits

Human pigmentation is above all determined by the amount, type and distribution of the pigment melanin. The pigment is a biopolymer produced in a complex biochemical process called “melanogenesis”. Melanin is produced in the melanocytes – special cells that in humans develop from the neural crest in the second month of gestation and migrate (as immature melanoblasts) to the skin and the anterior uveal tract, or to the iris. In the skin, the melanocytes are situated in the basal epidermal layer, i.e. immediately above the dermis. In total, the melanocytes account only for approximately 5% of epidermal cells; the main components of the epidermis are the keratinocytes. Some melanocytes migrate further to the developing hair follicles, from which hair shafts grow. Active melanocytes are located in the hair bulb slightly above the hair papilla and immediately below the population of keratinocytes, which will later form the cortex. The melanocytes migrate to the hair follicles in a predetermined manner, thanks to the activity of the c-kit receptor with its *KITLG* ligand, also known as the stem cell factor (SCF), which is produced by the hair bulb cells [81, 86]. The melanocytes from the hair follicles differ from skin melanocytes – the former are larger, have more numerous dendritic processes and produce larger melanosomes [86]. It should be mentioned here that the epidermal melanocytes and hair follicle melanocytes operate independently. As early as in 1908, Holmes and Loomis noted that inheritance of eye and hair colour is to some degree independent [47]. It is easy to observe that in populations of European ancestry, there are individuals with black hair and fair skin and also, conversely, fair-haired and dark-skinned people. Studies carried out by Branicki et al. (2008) showed that 16% of individuals from the investigated Polish population had black hair and dark skin type [12]. Robins (2005) presented an extreme example of Aborigines, among whom there were children with completely fair hair that turned dark only during puberty. At the same time, their skin remained dark all their life [81].

The process of melanogenesis occurs in special melanocyte cytoplasmic structures called melanosomes. Eumelanosomes produce the black-brown melanin variant called eumelanin, while feomelanosomes synthesise the red-yellow type called feomelanin. Mature melanosomes are subsequently released to the keratinocytes. The skin has so-called epidermal melanin units, composed of a single melanocyte and several dozen keratinocytes, to which melanin granules are transferred. Synthesis of hair pigment occurs in the hair follicle [86], in the so-called hair follicle pigment unit, composed of the melanocytes, keratinocytes and hair papilla fibroblasts. Similarly to the case of skin, eumelanin and feomelanin produced in the melanocytes are transported to the keratinocytes, which form the cortex and medulla of the hair. A major part of the pigment is transported to the hair cortex, a slightly smaller amount to the hair medulla, and a scant amount only to the sheath of the hair shaft. The process of pigment synthesis occurs solely during the anagen phase, i.e. in the phase of hair growth. The number of melanocytes in the skin and hair follicles decreases with age, which, in the case of hair, is associated with turning grey. Interestingly, the decreasing number of melanocytes does not result in the skin becoming fairer; on the contrary, with age, the reverse tendency is observed [81]. In the case of individuals of European and Asian ancestry, the melanosomes in the keratinocytes occur mainly in complexes, while in individuals of African descent, they are single and scattered. Thus, it seems that the genes responsible for melanosome formation may play a significant role in relation to differences in human pigmentation phenotype.

Eye colour is determined by the distribution and contents of the melanocytes situated in the uveal tract, and more specifically, in its anterior part called the iris [93]. The innermost layer of the iris or the iris pigment epithelium is composed of tightly packed pigment-containing cells, but the distribution of pigment in this layer is identical in individuals having different eye colour. The outer layer of the iris, or the anterior iridial stroma, consists of the connective tissue, fibroblasts and melanocytes, which contain melanin stored in the melanosomes. It is believed that it is precisely this layer that plays a decisive role in determining eye colour [50]. No differences in the number of melanocytes themselves have been observed for particular eye colours. However, differences have been demonstrated to be associated with the number of melanosomes and the amount and type of the pigment itself, i.e. with melanocyte activity. Wakamatsu et al. (2008) demonstrated that in the case of light eye colour, the amount of eumelanin was lower as compared to eyes of

a darker colour. The reverse, although not statistically significant effect, was obtained for feomelanin [106]. Albino individuals have no pigment at all, and their eyes may appear pink as an effect of blood vessels reflecting the light.

## 2.2. Basic genes involved in the process of melanogenesis

Pigment synthesis is a complex biochemical process, in which numerous enzymatic, structural, regulatory, transport and receptor proteins, as well as their ligands are involved. As has been mentioned previously melanogenesis occurs in two types of lysosome-like melanocyte structures called eumelanosomes and feomelanosomes. Mature eumelanosomes differ from feomelanosomes in their ellipsoid shape (the feomelanosomes are spherical in shape) and lamellar structure [53]. Melanin, a potent electron acceptor, is known to be capable of neutralising free radicals and thus protects the cells against DNA damage [81]. Generally, there is no doubt that eumelanin exhibits photoprotective properties. However, it transpires from some investigations that feomelanin may have a contrary effect and sensitize the tissues to the activity of ultra-violet light and emerging free radicals, although the effect may also be indirectly evoked by a decreased cysteine level in association with feomelanin synthesis itself [1, 87, 101]. The first stage of the synthesis of both melanin forms is catalysed by tyrosinase (TYR), which is, therefore, a key enzyme in the process of melanogenesis. This stage consists in double oxidation of tyrosine, with the resultant formation of dopaquinone. The subsequent stages are different for the eumelanin and feomelanin synthesis paths. To be synthesized, the latter requires the presence of yet another amino acid – cysteine (Figure 1). A significant role in the process of melanogenesis is played by the product of the *MC1R* gene – a seven-pass transmembrane G-protein-coupled receptor. Following the receptor activation by the melanotropic hormone  $\alpha$ -MSH, the concentration of c-AMP increases and positive regulation of eumelanin synthesis is achieved. In mice, the *Mc1r* receptor antagonist is the *Asip* gene product, which positively regulates feomelanin synthesis. Some reports suggest a similar role for the *ASIP* gene in humans [5, 56]. To date, the function of several other genes associated with melanogenesis and pigment distribution has been explained. The *SLC45A2* gene is most likely responsible for transport and intracellular tyrosinase processing [21]. The product of the *OCA2* gene is an integral melanosome membrane protein that is responsible for anion transport, and hence for intra-melanosome pH

regulation [74]. The *SLC24A5*, *SLC24A4* and *TPCN2* genes are members of the calcium ion transporter group; the concentration of calcium is of considerable importance for the process of melanogenesis and melanosome development [61, 96]. *KITLG*, encoding the ligand for KIT receptor tyrosine kinase, is important from the viewpoint of melanocyte migration and development [109]. The *MYO5A* gene is involved in the process of melanosome transport. The *TYRP1* and *DCT* genes (the latter is also known as *TYRP2*) are involved in the eumelanin synthesis pathway. The type (eumelanin, feomelanin), amount and distribution of melanin are decisive factors in the colour of skin, eyes and hair, and thus mutations involving the above-mentioned genes may significantly affect pigmentation.

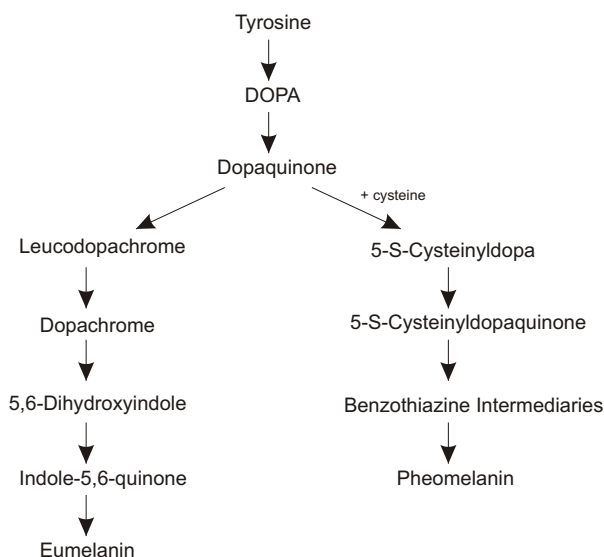


Figure 1. A scheme illustrating eumelanin and feomelanin synthesis.

## 3. Genetic mapping

Genetic mapping is carried out based on two essential methods, i.e. linkage analysis and association study [104]. The former has been in use for many years and yields good results, especially when searching for genes responsible for determining high-penetration traits (a high percentage of individuals possessing a specific variant, who demonstrate a given trait) and in recessive inheritance patterns. The latter method has gained much importance in recent years, becoming particularly useful in analyzing complex traits. Both the methods rely on taking advantage of a genetic phenomenon called linkage disequilibrium, manifested as the presence of haplotypes and thus a shared inheri-

tance of chromosome segments. To perform both types of analyses, it is necessary to employ genetic markers characterised by a defined location in the human genome. Linkage analysis is most commonly carried out based on microsatellite sequences that are characterized by their high polymorphism, while association studies are based on SNP-type polymorphisms.

In the case of linkage analysis, experimental samples originate from family members of whom more than one individual demonstrates the analyzed phenotypic effect (it may be a disease entity or a physiological feature). In the case of traits showing a simple mode of Mendelian inheritance, the standard method of linkage analysis known as the parametric method may be employed. Its use is associated with defining a genetic model, in which the mode of inheritance (among other aspects) must necessarily be taken into consideration. Defining a genetic model is, however, difficult or entirely impossible in the case of polygenic traits. In this case, another, so-called non-parametric variant of linkage analysis is employed [23, 83]. In practice, a commonly used solution is genotyping of siblings that demonstrate the investigated phenotype. The objective of the investigations is to find a genetic marker that would segregate different members of the same family in the same way as the analyzed phenotypic trait. Identification of such a marker subsequently allows us to assume that somewhere in its vicinity there is a functionally important polymorphic position. The resolution of the method is not high, which necessitates further detailed studies to enable finding of the *locus* that is responsible for determination of a given trait. It was linkage analysis that allowed scientists to determine that the loci associated with eye colour inheritance are located in a particular region of chromosome 15 [27].

The general principle underlying association studies is also simple; the analysis is carried out for two groups of unrelated individuals, the first of which demonstrates a phenotype effect, while the other constitutes the controls, being without the effect. Demonstrating that one allele is significantly more frequent in the group of individuals with the investigated phenotype effect as compared to the controls allows us to adopt the hypothesis that in the region in which the marker is situated, there may be a *locus* responsible for determining the analyzed trait. The statistical significance of the differences in frequency values may be demonstrated, for example, by means of a simple <sup>2</sup> test or regression methods. The use of the latter allows testing of multi-variable models. Statistical methods that are employed in association studies were clearly presented by Balding (2006) [3]. In spite of the fact

that the resolution of association studies is higher as compared to linkage analysis, in the past, the use of the association study method had to be limited to selected chromosome regions (association studies of so-called candidate genes) due to technical reasons [46]. Such studies could then constitute another step on the path to identifying a gene, or even a particular polymorphism responsible for determination of the investigated trait. Association studies which focused on a region indicated by previously performed linkage analysis allowed precise identification of two eye colour inheritance-associated polymorphisms in the *OCA2* gene situated on chromosome 15 [76]. At present, when hundreds of thousands of markers may be simultaneously analysed, there are no impediments to employing the association study method as a screening test (in place of or in combination with linkage analysis) [e.g. 57]. Investigations of this type are called Genome-Wide Association Studies (GWAS). They consist in analyzing approximately 300,000 (at present even more than 900,000; [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) SNP-type positions that are regularly distributed within the entire genome and allow detection of regions that demonstrate associations with the investigated phenotype trait. Investigations are carried out using the DNA microarray technology ([www.illumina.com](http://www.illumina.com); [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Association studies also provide an effective method of genetic mapping in the case of low penetration alleles associated with polygenic traits [e.g. 42, 96, 108].

#### 4. Genes associated with human pigmentation

##### 4.1. Identification of genes associated with human pigmentation

The majority of human phenotypic traits are polygenic in character. Decoding of the human DNA sequence [62] has led to a rapid increase in the number of data on variations characteristic for populations with different biogeographical ancestry. This has facilitated various types of investigations, among them studies on selective pressure on various areas of human genome and association between particular genetic variants and various types of complex traits. It has become possible to more effectively detect DNA regions associated with a phenotypic effect and determine the so-called candidate genes that play a potential role in trait determination. Of the two basic methods of genetic mapping, the method of association studies is more useful in relation to traits with multi-gene inheritance patterns (showing a moderate or small phenotypic ef-

fect). The method of association studies involving the entire genome GWAS is particularly successful (in the context of pigmentation traits as well). As has previously been mentioned, pigment synthesis and distribution is a complex biochemical and cellular process. The natural variability of pigmentation traits is assumed to be possibly controlled by as many as 127 genes [9]. To date, only several of these genes have been extensively understood. Identification of some genes involved in the pigmentation process has been facilitated by the association of these genes with inheritance of extreme pigmentation phenotypes, e.g. oculocutaneous albinism. The inheritance pattern is Mendelian in character and hence it is relatively easy to investigate. Lack of functionality in a single gene causes interruption of a significant metabolic pathway, which hinders or markedly limits pigment synthesis. To date, four genes responsible for various forms of oculocutaneous albinism in man have been described [39]. The tyrosinase gene (*TYR*; MIM: 606933) is responsible for two different forms of albinism, including the most severe form, i.e. OCA1A (oculocutaneous albinism type 1A). Another form, OCA1B, is slightly milder, and in time, some amount of pigment may appear in the affected individuals. A less severe clinical form is also associated with mutations causing albi-

nism type OCA2 (the *OCA2* gene; MIM: 611409) and OCA4 (the *SLC45A2* gene; MIM: 606202). Albinism type OCA3 is caused by mutations of the tyrosinase related protein 1 gene (the *TYRP1* gene; MIM: 115501) and manifests in red hair and reddish skin hue in Africans [39]. Since the products of these genes fulfil such key functions in the process of melanin synthesis, it seems that it is logical to acknowledge them as candidate genes in studies on natural pigmentation variation in man.

#### 4.2. Genes correlated with physiological variations of pigmentation traits

Table I presents the genes for which associations have been determined with the human pigmentation phenotype. The first and to date the best understood gene of fundamental importance for natural variability of human pigmentation is the *MC1R* gene (MIM: 155555). *MC1R* is composed of a single 951 bp long exon that encodes a protein for the type 1 melanocortin receptor. In 1995, Valverde et al. analysed the variations of the *MC1R* gene sequence and observed that mutated alleles were predominantly seen in red-haired and fair-skinned individuals [101]. Similar investigations were subsequently carried out for numerous pop-

TABLE I. GENES ASSOCIATED WITH HUMAN PIGMENTATION

Gene	Location	Function	Postulated association with natural pigmentation
<i>POMC</i>	2p23.3	MC1R receptor agonist	Hair, skin colour
<i>SLC45A2 (MATP)</i>	5p13.3	Tyrosinase transporter	Eye, hair, skin colour
<i>IRF4</i>	6p25-p23	Transcription factor	Hair, skin and eye colour
<i>TYRP1</i>	9p23	Melanogenic enzyme	Eye colour
<i>TPCN2</i>	11q13.2	Calcium ion transporter	Hair colour
<i>TYR</i>	11q14-q21	Melanogenic enzyme	Eye colour
<i>KITLG</i>	12q22	Ligand for tyrosine kinase receptor Kit	Hair colour
<i>DCT (TYRP2)</i>	13q31-q32	Melanogenic enzyme	Eye colour
<i>SLC24A4</i>	14q32	Calcium ion transporter	Hair, eye colour
<i>OCA2</i>	15q11.2-q12	Anion transporter	Eye colour Hair colour
<i>HERC2</i>	15q13.1	Unknown	Eye, hair, skin colour
<i>MYO5A</i>	15q21	Cytoplasmic transporter	Eye colour
<i>SLC24A5</i>	15q21.1	Calcium ion transporter	Skin colour
<i>MC1R</i>	16q24.3	G-Protein coupled receptor	Hair colour Skin colour
<i>ASIP</i>	20q11.2	MC1R receptor antagonist	Hair colour, eye colour

ulations worldwide and the above conclusions were confirmed [11, 13, 43, 54, 73, 75]. The *MC1R* gene is the chief gene responsible for determining the phenotype manifesting as red hair and fair skin, which has been termed RHC (red hair colour). More than 60 polymorphic loci, either nonsynonymous or nonsense, have been described within the *MC1R* gene [34]. Among these polymorphisms, two groups of mutations have been distinguished that are significant from the viewpoint of phenotype prediction, namely the R group, playing a significant role in RHC phenotype determination, and the r group, characterised by a lower degree of correlation with the phenotype [55, 91]. The original list of variants marked as R was limited to four SNP-type positions, i.e. rs1805006 (D84E), rs1805007 (R151C), rs1805008 (R160W) and rs1805009 (D294H). The list has been extended to include the following variants: rs11547464 (R142H), rs1110400 (I155T) and all nonsense mutations, e.g. 86insA. A major place in the r group is occupied by rs1805005 (V60L), rs2228479 (V92M) and rs885479 (R163Q). Functional studies carried out for the most significant RHC phenotype-associated polymorphisms have confirmed the fact that mutations of R142H, R151C, R160W and D294H significantly diminish the receptor function [8, 44]. The mechanism underlying the activity of these mutations has not been fully elucidated and it seems that it may be different in the case of different polymorphisms. Indeed, a significantly decreased expression of cell surface receptor has been observed in the case of the V60L, D84E, R151C, I155T, R160W and R163Q alleles, while no such effect has been noted in the R142H and D294H alleles. In the case of the former group of mutations, decreased cAMP synthesis effectiveness has been demonstrated to be proportional to a lower expression in the cellular membrane. In the two remaining mutations, the effect may be triggered by decreased binding of G protein or a lower affinity to the receptor agonist, i.e. -MSH hormone [7, 8]. The RHC phenotype has been confirmed to largely follow a recessive pattern of inheritance, but at the same time, the effect of the *MC1R* gene mutation is quantitative, and thus individuals already having one mutated allele usually have fairer skin, and its effect may also manifest itself, for example, as partially red facial hair in males or as freckles [31, 91]. A very few R/0 heterozygotes (with one non-mutated allele) may also be characterized by the RHC phenotype. The association of the *MC1R* gene mutation with freckles has been confirmed not only for the European [5], but also the Asian population [69]. The practical usability of *MC1R* gene polymorphism analysis has been confirmed in forensic reports [16, 38].

Homozygotes having two mutated R alleles and compound R/R heterozygotes in the majority of cases have the RHC phenotype. In view of its relatively high frequency in the population, from the viewpoint of RHC phenotype inheritance, the highest importance is ascribed to the R151C and R160W loci. These two polymorphic positions and other polymorphisms classified as R have high predictive value, especially in populations inhabiting northern regions of Europe. In the Polish population, approximately 97% of individuals with the 151C/151C, 160W/160W and 151C/160W genotypes were found to be red-haired [13]. In the United Kingdom (and especially in Ireland), where the percentage of individuals having the RHC phenotype is considerable, analysis of gene variations has been employed in some forensic cases, thus obtaining important data of an operative character, which has allowed investigations to be guided in an appropriate direction [99]. Pastorino et al. (2004) investigated the Italian population, detecting cases where individuals with two mutated R alleles did not demonstrate the characteristic RHC phenotype. A conclusion arises that in populations with darker pigmentation, the effect of the *MC1R* gene may be masked by other genes [73]. The effect of the *MC1R* gene mutation on eye colour has not been unequivocally confirmed. The majority of investigations indicate, however, that mutations involving the gene do not affect iris colour in humans [13, 31, 32]. The *MC1R* gene definitely exerts a pleiotropic effect. The role of *MC1R* has been demonstrated in inheritance of predispositions to skin carcinoma development, including malignant melanoma [e.g. 17, 100]. At present, the prevailing opinion is that the role is independent of the effect on the pigmentation phenotype itself [55]. Mutations of the *MC1R* gene have also been shown to be associated with pain sensation in females [67]. An interesting aside is that *MC1R* polymorphism has also been investigated in fossilised Neanderthal remains. The studies have demonstrated a polymorphism that is absent in modern humans and which should be classified as a mutation responsible for RHC phenotype determination. The results indicate that the Neanderthals, similarly to representatives of *Homo sapiens*, might have been characterised by variability of the pigmentation phenotype, which would be an example of a parallel evolution of these two forms of humans [60].

Krude et al. (1998) described a mutation in *POMC* exon 3 (MIM: 176830), leading to its premature termination and in consequence lack of expression products: adrenocorticotrophic hormone ACTH, melanocyte-stimulating hormone -MSH and -endorphin. In addition to various abnormalities, these patients

were also characterised by the RHC phenotype, which confirmed the key role in the process of eumelanin synthesis fulfilled by MC1R receptor activation by -MSH, acting as its agonist [59]. Höiom et al. (2008) recently described new mutations in the *POMC* gene in individuals with the RHC phenotype, who did not have mutations involving the *MC1R* gene; it is likely that the former gene is a more significant determinant of red hair colour than was originally thought. However, the issue requires further investigation [48]. Another gene that may be responsible for determination of the RHC phenotype is the *ASIP* gene (MIM: 600201). Investigations carried out in a mouse model have demonstrated that the product of the *Asip* gene is a natural Mc1r receptor antagonist [65]. The human *ASIP* gene consists of three translatable exons, which encode a 132 amino acids long protein. Kanetsky et al. (2002) investigated the *ASIP* gene variations and demonstrated an association between the rs6058017 (A8818G) locus in the 3' untranslated region (3'UTR) and human pigmentation phenotype [56]. In the population investigated by the above authors, the G allele was correlated with a darker colour of the hair and eyes. The researchers proposed a mechanism of the role of the 3'UTR region in mRNA stabilisation; according to their theory, the G allele was supposed to cause transcript destabilisation, which would decrease the ASIP antagonist concentration and in consequence positively regulate eumelanin synthesis. A decreased G allelic mRNA level was confirmed experimentally by Voisey et al. (2006). The researchers also demonstrated statistically significant differences in the A and G allele frequency in European populations and in Aborigines, as well as confirmed the association between the G allele and darker hair colour in individuals of European ancestry [105]. Differences in allele frequency between individuals of European, Asian and African ancestry were previously demonstrated by Zeigler-Johnson et al. (2004) [113], and confirmed by other authors [10]. However, the association of the 8818G allele and dark pigmentation has not been confirmed in all populations [17, 32, 63]. The results of more extensive studies carried out by Norton et al. (2007) indicate that the differences in the A8818G polymorphism frequency constitute a reflection of a division of populations into African and non-African rather than into populations having fairer and darker pigmentation [72]. Other indirect evidence confirming the association of the *ASIP* gene and the RHC phenotype was presented by Sulem et al. (2008). They demonstrated a haplotype association (rs1015362 and rs4911414) in the region where the *ASIP* gene is located with red hair, freckles and susceptibility to sun-

burn [95]. The same group of investigators also observed an association between these positions and susceptibility to skin carcinomas [40].

The *OCA2* gene, in addition to its previously mentioned role in inheritance of oculocutaneous albinism, is one of the essential genes that determine the variations of iris colour in humans. In the early 20<sup>th</sup> century, when the importance of Gregor Mendel's works on inheritance was recognised [66], attempts were made at explaining variations of eye colour by Mendelian genetics [22, 49]. Today, we are well aware of the fact that eye colour is a polygenic trait. The linkage analysis performed by Eiberg et al. (1996) showed that at least three loci [27] are responsible for determination of physiological variations in eye colour – a locus located on chromosome 19, which has been termed EYCL1 (GEY) and two loci on chromosome 15, i.e. EYCL2 (BEY1) and EYCL3 (BEY2). Eiberg et al. (1996) also suggested that the EYCL3 locus may correspond to the *OCA2* gene, which at the time was known as the P gene. The *OCA2* gene consists of twenty-four exons, which encode an 838 amino acid long protein that is an integral melanosomal membrane protein. The role of the *OCA2* gene in eye colour inheritance was confirmed by Rebbeck et al. (2002). Their association studies demonstrated that two nonsynonymous positions, rs1800401 and rs1800407, within the gene may independently affect iris colour in humans [76]. Frudakis et al. (2003) selected the candidate genes and analysed 754 SNP polymorphisms, both within the known pigmentation genes and in other genomic regions, including the genes responsible for xenobiotic metabolism. These investigations confirmed that a significant role in eye colour determination is fulfilled by the region of chromosome 15, in which the *OCA2* gene is located [32]. Genetic mapping by the method of linkage analysis performed by Zhu et al. (2004) also indicated the very same region of the human genome. Based on the results of these studies, it was suggested that a single gene, i.e. *OCA2*, is responsible for approximately 70% of eye colour variation in humans [114]. Further investigations of the *OCA2* gene showed that a significant role in pigmentation is played by three nucleotide positions situated in intron 1 [25], which indicated a significant role of *OCA2* gene expression regulation in determining the trait. Branicki et al. (2008) analysed a dozen-or-so SNP positions in the *OCA2* gene and using the method of tree scanning [98], which allows the genetic relationship between haplotypes to be determined, demonstrated that a single position, i.e. a nonsynonymous change rs1800407 (R419Q) is of significance in eye colour determination. The investigations also confirmed

earlier results that suggested an association of the mutation with green eye colour. At the same time, it was demonstrated that the polymorphism is responsible only for 4% of variation of iris colour characteristic for the studied population [14]. Since the studies took into account all the nonsynonymous changes in the *OCA2* gene characterized by a significant frequency level, the result confirmed in an indirect way the suggestion formulated by Duffy et al. (2007) concerning the role of gene expression regulation in determination of iris colour variations. When analysing their result of GWAS, Sulem et al. (2007) formulated a hypothesis stating that in this genomic region, the key role in determination of the pigmentation phenotype might be fulfilled by the effect of interaction between two neighbouring genes, *HERC2* (MIM: 605837) and *OCA2* [96]. The *HERC2* gene was previously putatively associated with Angelman syndrome and Prader-Willi syndrome, in which affected patients often demonstrate hypopigmentation [71]; in addition, interaction of *HERC2* with the *OCA2* gene was postulated in relation to studies carried out in mice [107].

*HERC2* is a large gene consisting of ninety three exons; it has a highly conservative structure and encodes a 4834 amino acids long protein [52]. Apart from the above data, unfortunately, not much is known about the function of the *HERC2* gene. In 2008, two independent groups of investigators almost simultaneously demonstrated that the *HERC2* gene may exercise a regulatory function for the *OCA2* gene [57, 92]. In addition, it appears that Sturm et al. (2008) found a polymorphism that may have a functional effect. The polymorphic position rs12913832 is located in the conservative intron 86 of the *HERC2* gene, in which transcription factor binding sites are also situated [92]. Eiberg et al. (2008) presented the results of their functional experimental studies, which indicate that a sequence around position rs12913832 may play the role of a silencer. A mobility shift assay showed that two alleles in this position exhibit different affinities to protein factors, and may thus differ in their strength of binding with transcription factors [28]. Branicki et al. (2009) analysed five postulated key positions for blue or brown eye colour inheritance in the *OCA2* and *HERC2* genes and using the multiple logistic regression method and haplotype analysis demonstrated that SNP rs12913832 was of the highest significance. The studies showed that the effect of this position is not limited to eye colour alone, but that the position also affects the remaining pigmentation traits. The investigations also confirmed the observations made by, among others, Holmes and Loomis in 1908 [47] on the recessive character of the alleles responsible for deter-

mination of lighter pigmentation traits [15]. These and other studies also showed that the rs1800407 position in the *OCA2* gene remains independently associated with eye colour inheritance, playing a modulatory role for the rs12913832 position in the *HERC2* gene [15, 92]. Analysis of the rs12913832 polymorphism allows prediction of iris colour on a very general level only: blue as opposed to brown. Further studies are necessary to increase the reliability and precision of a future test for eye colour prediction; it seems, however, that this is yet another trait that may soon be subject to a reliable prediction analysis.

The *SLC45A2* gene, also known as membrane associated transporter protein (MATP), is among genes characterised by a well-documented role in determination of natural variability of human pigmentation phenotype. The gene consists of seven exons and encodes a 530 amino acids long protein. As has been mentioned previously, some mutations in the *SLC45A2* gene are responsible for oculocutaneous albinism type 4, which – interestingly – is the most common form of albinism in the Japanese population [51]. It has been noted that polymorphism rs16891982 (L374F) may be useful in analysing biogeographical ancestry [111, 112]. It has also been demonstrated that the *SLC45A2* locus was under positive selection [e.g. 64, 88]. Graf et al. (2005) described an association between two nonsynonymous polymorphisms in exons 3 and 5 and natural variation of skin, hair and eye colour in individuals of European ancestry. It has been observed, however, that the rs26722 (E272K) and rs16891982 (L374F) positions are in genetic linkage, which has given way to doubts as to their independent effect on pigmentation traits [37]. Han et al. (2008) have claimed that the rs16891982 position is associated with skin and hair colour, as well as with susceptibility to sunburn [42]. Also Fernandez et al. (2008) observed that the L374 allele is statistically more common in individuals with darker pigmentation and, moreover, protects against skin carcinomas [29]. Branicki et al. (2008) noted a correlation of the ancestral L374 allele solely with darker hair colour, but did not observe any associations with skin and eye colour. Such a result may be a consequence of the small size of the examined population sample combined with a low frequency of this allele in the studied population. Lack of replication of association studies is a relatively common phenomenon and may be the consequence of such factors as inter-population differences in allele frequency and genetic linkage structure, a hidden population substructure, as well as genetic interactions [35, 68]. Association studies on the rs26722 and rs16891982 polymorphisms carried out to date have



shown that most likely only the latter is associated with pigmentation phenotype determination, and the effect of the former mutation is a result of a linkage [12, 37, 42]. Also Soejima et al. (2006), having performed an analysis of the evolutionary status of alleles situated in these nucleotide positions, proposed that the phenotype effect is associated solely with the rs16891982 position [88]. Stokowski et al. (2007) demonstrated that the *SLC45A2* gene (the rs16891982 polymorphism) is correlated with skin colour in the population of South Asia [89]. The role of the promoter sequences of the *SLC45A2* gene in determination of the pigmentation phenotype suggested by Graf et al. (2007) [36] has not yet been confirmed in other populations [26, 42].

The *SLC24A5* gene, also known as *NCKX5* (MIM: 609802), is believed to be one of the most important genes responsible for determination of fair skin colour that is characteristic for the European population [61, 90]. The gene has been estimated to account for at least 25% of skin colour variations in Europeans versus Africans, which indeed places *SLC24A5* in a predominant position with respect to the magnitude of its phenotype effect. The *SLC24A5* gene consists of nine exons and encodes a 500 amino acids long protein. Its product is most likely responsible for maturation of the melanosomes, and thus for an important element of the process of pigment formation and distribution. It is worth recalling here that the size of melanosomes considerably differs in the European and African population. Lamason et al. (2005) demonstrated that the rs1426654 polymorphism (A111T) in exon 3 is associated with natural variations in skin colour in humans. The frequency of the ancestral allele A111 reaches almost 100% in African and Asian populations, while the 111T allele occurs with an almost 100% frequency in populations of European ancestry [19, 61]. From the previously mentioned studies on the South Asian population carried out by Stokowski et al. (2007), it follows that apart from the *SLC45A2* gene polymorphism, a significant role in determining skin colour variability in this region is executed by two other genes; one of them is the *SLC24A5* gene itself (rs1426654), while the other is the *TYR* gene (the rs1042602 polymorphism, S192Y). The effect of these three polymorphisms (genes) has been demonstrated to be additive and to explain a significant part of variations in skin colour in the South Asian population [89].

The *TYR* gene consists of five exons and encodes a 529 amino acids long protein, which plays a crucial role in synthesis of both types of melanin. The role of mutation in the *TYR* gene is extremely significant from the viewpoint of determination of the extreme pigmen-

tation phenotype known as oculocutaneous albinism; on the other hand, there are few reports on the association of the *TYR* gene with natural variations of human pigmentation. Extensive association studies carried out by Sulem et al. (2007) indicate that *TYR* may be associated with inheritance of eye colour and skin-related traits (freckles, susceptibility to sunburn), which points to its contribution in determining natural pigmentation in European populations as well [96].

The investigations by the group of Icelandic scientists (the above-mentioned report by Sulem et al. 2007 and another, also by Sulem et al. 2008) allowed identification of genes and genome regions which had not previously been taken into consideration as associated with pigmentation in humans [95, 96]. One such gene is *SLC24A4* (MIM: 609840), which has been demonstrated to correlate with eye and hair colour. This information was supported by Han et al. (2008); the researchers confirmed the significant correlation between the *SLC24A4* gene and hair colour and pointed to its possible involvement in susceptibility to sunburn [42]. The *SLC24A4* gene consists of eighteen exons that encode a 605 amino acids long protein, which – similarly to the product of the *SLC24A5* gene – is a calcium ion transporter. It seems that this group of proteins should be acknowledged as particularly interesting from the standpoint of pigmentation. Another calcium ion transporter that has been associated with pigmentation variations in man is the *TPCN2* gene. Interestingly, in the case of *TPCN2* (MIM: 612163), a correlation has been demonstrated solely with hair colour [95]. A previous observation should be recalled here, namely that inheriting hair, eye and skin colour has to be independent to a certain degree, and therefore determined by variations in various loci. *TPCN2* consists of twenty-five exons and encodes a 752 amino acids long protein product. Another selective marker of hair colour may be the *KITLG* gene (MIM: 184745) [96]. As has been mentioned before, the product of this gene is of fundamental significance in the migration of the melanocytes to the hair follicle. In mice, it is the expression of the *Kitlg* gene in particular groups of keratinocytes that determines whether the melanocytes will ultimately remain within the skin or whether they will migrate to the hair follicle [4]. The gene also demonstrated a correlation with hair colour in the population investigated by Han et al. (2008), although the correlation was characterised by low statistical significance [42]. The human *KITLG* gene has two isoforms: a (eight exons, 245 amino acids long protein) and b (nine exons, 273 amino acids long protein). Another postulated important determinant of hair, skin and eye colour in humans is the *IRF4* gene (MIM: 601900)

[42, 96]. Sulem and colleagues have determined that the polymorphic position between the *IRF4* and *EXOC2* gene on chromosome 6 is associated with pigmentation, but none of these genes have previously been linked with the pigmentation phenotype and for this reason, establishing which gene should be connected with the observed effect has been difficult. It follows from the investigations carried out by Han et al. (2008) that the *IRF4* gene is more likely to be associated with pigmentation variations (the correlation with pigmentation was much stronger for the polymorphism situated within the *IRF4* gene) [42]. Its product is a transcription factor involved in the process of gene expression regulation in response to the effect of interferon and other cytokines. The *IRF4* gene consists of eight exons and encodes a 451 amino acids long protein. Undoubtedly, not only genes with an established status of pigmentation genes, but also an entire group of genes for regulatory elements, for example transcription factors, may have a profound significance in pigmentation phenotype determination. As an interesting side note, we may quote the example of the mouse *Foxn1* gene. As was previously said, the transfer of melanin produced in the hair follicles is not accidental, since the pigment migrates mainly to the cells forming the cortex layer of the hair shaft. Weiner et al. (2007) suggest that it is the *FOXN1* gene which encodes a transcription factor that is responsible for facilitating melanin transfer to the strictly defined keratinocytes [110].

A correlation with natural pigmentation (eye colour) has been also shown for the *MYO5A* (MIM: 160777), *TYRP1* (MIM: 115501) and *TYRP2* genes, the latter being better known as *DCT* (MIM: 191275) [32, 95]. The *MYO5A* gene is responsible for melanosome transport [102]. It is a large gene consisting of thirty-eight exons and encoding an 1855 amino acids long protein. The products of the *TYRP1* and *DCT* genes occur solely in the eumelanosomes and are involved in the eumelanin synthesis pathway. *TYRP1* consists of seven exons and encodes a 537 amino acids long protein. It is included among the genes that are responsible for oculocutaneous albinism in man. The *DCT* gene consists of eight exons and encodes a 519 amino acids long protein. Both the genes most likely have a common evolutionary history, since they share an exon with the *TYR* gene. The *DCT* gene is assumed to be derived from the *TYRP1* gene, which was formed earlier via duplication of the *TYR* gene [94].

Phenotype variability in pigmentation may be a consequence of an additive contribution of many genes; however, we cannot rule out the possibility that a prominent role is played by their interactions. In 1909, Bateson pointed to epistatic effects that may

shape phenotype variation [6]. The first documented case of epistatic effects shaping the pigmentation phenotype was described by Akey et al. (2001). An independent analysis of polymorphisms in two significant pigmentation genes, i.e. *MC1R* and *OCA2*, failed to demonstrate their independent association with pigmentation phenotype in the investigated Tibetan population. However, when the epistatic model was taken into consideration, the genes were shown to play a significant role in skin pigmentation in the above-mentioned population [2]. King et al. (2003) demonstrated that mutations in the *MC1R* gene modify the effect of the *OCA2* gene alleles, which are responsible for determination of oculocutaneous albinism. Patients affected by albinism type 2, who had variants of the *MC1R* gene associated with RHC, were also red-haired [58]. Earlier in the present paper, the author described the postulated role of an interaction between the *OCA2* and *HERC2* genes in determining iris colour in humans. Branicki et al. (2009) demonstrated that the *HERC2* gene may also exhibit epistatic activity with respect to the *MC1R* gene. In keeping with the presented model, the allele of *HERC2* (rs12913832) that is associated with darker pigmentation may neutralise the effect of the *MC1R* gene mutation, which is responsible for determination of fairer skin types. The effect has been observed in heterozygotes having one mutated R variant of the *MC1R* gene [15].

To date, only a small portion of genes that may determine human pigmentation phenotypes has been investigated. Of high significance in association studies is replication of original results arrived at in other population samples, and thus, many elementary investigations of this type are necessary. Moreover, no functional studies have been carried out for the majority of the described polymorphisms; such studies are capable of confirming the role of particular polymorphic positions in determination of phenotype traits and may allow us to determine the mechanism underlying their effect. It appears, nevertheless, that the growing body of data will soon make it possible to generate a more detailed description of mechanisms leading to worldwide natural variations of the human pigmentation phenotype. The forensic aspect of pigmentation trait prediction is also viewed with optimism.

## 5. Studies of epistasis

Bateson observed that a variant of one gene may make manifestation of a complete phenotype effect evoked by another gene impossible. This phenomenon is termed “epistasis” or “genetic interactions” and is

defined in keeping with Bateson's views as the masking of the phenotypic effect of one gene by genetic variants of another gene [6]. According to another definition, more statistical in character, epistasis is the lack of additiveness in a mathematical model that describes a relation between genetic variants and a trait of polygenic nature [20, 30]. It has been postulated that genetic interactions may extensively contribute to the process of determination of complex traits in humans, similarly to interactions on the molecular level constituting an important element – to use an example – gene expression regulation or signal transduction [18, 68]. Today, epistasis remains a poorly understood issue, similarly to polygenic trait genetics itself. Data have emerged that indicate that epistatic effects should be taken into consideration when a researcher investigates determination of pigmentation phenotype [2, 15, 28]. Two basic groups of statistical methods may be distinguished which enable the study of epistasis [70, 103]. The former group includes various regression variants, amongst which the most popular are linear and logistic regression. Selection of one of these methods depends on the type of available data, or, to be more precise, on the character of the investigated phenotype trait that constitutes the explained variable (a variable of a continuous character suggests the use of linear regression, while one of a dichotomic character prompts the employment of logistic regression). Eye colour, which is a continuous variable, is, nevertheless, often investigated by logistic regression through reduction of data to just two categories, e.g. blue eyes *versus* non-blue eyes. A low number of data and a high number of degrees of freedom may lead to the more frequent occurrence of a type one error, namely to obtaining false positive results when employing regression methods. The latter group of methods includes methods of dimensionality reduction. This group encompasses the increasingly popular method of multi-factor dimensionality reduction (MDR) [79]. MDR enables reduction of a multidimensional model through classifying all the genotypes as belonging to one of two groups. In consequence, a single variable is obtained, which has two multifactorial categories (“high risk” and “low risk”) that refer to possession of a given phenotype [41]. The MDR method is non-parametric and each constructed unidimensional model is evaluated by means of permutation tests and cross-validation; therefore, the method may be particularly effective in detection of genetic interactions. In addition to various variants within the two groups of methods, a method originating from the sphere of pattern recognition has also been proposed. It is based on employing machine learning, and thus on

practical implementation of the concept of artificial intelligence [80]. So far, however, the method has not been commonly employed in analysing epistatic effects.

## 6. Summary

Of the predicted 127 genes associated with pigmentation in humans [9], only a few (*MC1R*, *OCA2*, *SLC45A2*, *ASIP*) are well understood with respect to their polymorphism and its association with phenotype traits. At present, for forensic purposes, it is possible to predict red hair colour [13, 38]; one may expect that non-commercial tests allowing eye colour prediction will appear soon. Numerous new data on potential genes (genome regions) have been provided by Genome-Wide Association Studies, which, however, constitute but the first step on the road leading to identification of polymorphisms responsible for phenotype effect. Further detailed investigations, including functional analyses, will allow identification of pinpointed polymorphisms that are causative variants in phenotype determination. When investigating the effect of genes exerted on pigmentation phenotype, one should take into consideration not only the possibility of an additive role of numerous genes, but also of epistatic effects between these genes. In consequence, such studies will make it possible to understand the genetic and molecular mechanisms that are responsible for determination of pigmentation traits in man. The research will also allow reliable prediction of phenotype traits assuming a minimum number of analyzed polymorphic positions. In view of the considerable complexity of prediction analyses (a high number of polymorphisms, their varying importance for the phenotype and the varying character of their interactions), statistical processing of their results will require appropriate tools and statistical software, such as use of the Bayesian network concept.

### Acknowledgement

This paper is dedicated to the memory of Aleksander Głazek, the long-serving director of the Institute of Forensic Research in Krakow. Without his strong support at each stage of my research activities, I cannot even imagine that I would have prepared the present review or completed my previous papers on genetic prediction of pigmentation phenotype.

## References

1. Abdel-Malek Z. A., Knittel J., Kadekaro A. L. [et al.], The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes – a shift in paradigm, *Photochemistry and Photobiology* 2008, 84, 501–508.
2. 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.
3. Balding D. J., A tutorial on statistical methods for population association studies, *Nature Review in Genetics* 2006, 7, 781–791.
4. Barsh G., Cotsarelis G., How hair gets its pigment, *Cell* 2007, 130, 779–781.
5. Bastiaens M., ter Huurne J., Gruis N. [et al.], The melanocortin-1-receptor gene is the major freckle gene, *Human Molecular Genetics* 2001, 10, 1701–1708.
6. Bateson W., Mendel's principles of heredity, Cambridge University Press, Cambridge 1909.
7. Beaumont K. A., Newton R. A., Smit D. J. [et al.], Altered cell surface expression of human *MC1R* variant receptor alleles associated with red hair and skin cancer risk, *Human Molecular Genetics* 2005, 14, 2145–2154.
8. Beaumont K. A., Shekar S. N., Newton R. A. [et al.], Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for *MC1R* variant alleles, *Human Molecular Genetics* 2007, 16, 2249–2260.
9. Bennett D. C., Lamoreux M. L., The colour loci of mice – a genetic century, *Pigment Cell Research* 2003, 16, 333–344.
10. Bonilla C., Boxill L. A., Donald S. A. [et al.], The 8818G allele of the agouti signaling protein (*ASIP*) gene is ancestral and is associated with darker skin color in African Americans, *Human Genetics* 2005, 116, 402–406.
11. Box N. F., Wyeth J. R., O'Gorman L. E. [et al.], Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair, *Human Molecular Genetics* 1997, 6, 1891–1897.
12. Branicki W., Brudnik U., Draus-Barini J. [et al.], Association of the *SLC45A2* gene with physiological human hair colour variation, *Journal of Human Genetics* 2008, 53, 966–971.
13. Branicki W., Brudnik U., Kupiec T. [et al.], Determination of phenotype associated SNPs in the *MC1R* gene, *Journal of Forensic Sciences* 2007, 52, 349–354.
14. Branicki W., Brudnik U., Kupiec T. [et al.], Association of polymorphic sites in the *OCA2* gene with eye colour using the tree scanning method, *Annals of Human Genetics* 2008, 72, 184–192.
15. Branicki W., Brudnik U., Wojas-Pelc A., Interactions between *HERC2*, *OCA2* and *MC1R* may influence human pigmentation phenotype, *Annals of Human Genetics* 2009, 73, 160–170.
16. Branicki W., Wolańska-Nowak P., Brudnik U. [et al.], Forensic application of a rapid test for red hair colour prediction and sex determination, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 69, 37–51.
17. Brudnik U., Branicki W., Wojas-Pelc A. [et al.], Contribution of variation in melanocortin 1 receptor and agouti signaling protein to cutaneous melanoma and basal cell carcinoma in a Polish population, *Experimental Dermatology* 2009, 18, 167–174.
18. Carlborg O., Haley C. S., Epistasis: too often neglected in complex trait studies?, *Nature Reviews Genetics* 2004, 5, 618–625.
19. Cook A. L., Chen W., Thurber A. E. [et al.], Analysis of cultured human melanocytes based on polymorphisms within the *SLC45A2/MATP*, *SLC24A5/NCKX5*, and *OCA2/P* loci, *Journal of Investigative Dermatology* 2009, 129, 392–405.
20. Cordell H. J., Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans, *Human Molecular Genetics* 2002, 11, 2463–2468.
21. Costin G. E., Valencia J. C., Vieira W. D. [et al.], Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (*uw*) mutation. A model for oculocutaneous albinism (*OCA*) type 4, *Journal of Cell Science* 2003, 116, 3203–3212.
22. Davenport G. C., Davenport C. B., Heredity of eye-color in man, *Science* 1907, 26, 589–592.
23. Dawn Teare M., Barrett J. H., Genetic linkage studies, *Lancet* 2005, 366, 1036–1044.
24. 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.
25. Duffy D. L., Montgomery G. W., Chen W. [et al.], A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of *OCA2* explains most human eye-color variation, *American Journal of Human Genetics* 2007, 80, 241–252.
26. Draus-Barini J., Marcińska M., Brudnik U., Branicki W., Polymorphism of the *SLC45A2* gene and prospects for its application in forensic science, *Problems of Forensic Sciences* 2009, 77, 79–88.
27. Eiberg H., Mohr J., Assignment of genes coding for brown eye colour (*BEY2*) and brown hair colour (*HCL3*) on chromosome 15q, *European Journal of Human Genetics* 1996, 4, 237–241.
28. Eiberg H., Troelsen J., Nielsen M. [et al.], Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression, *Human Genetics* 2008, 123, 177–187.
29. Fernandez L. P., Milne R. L., Pita G. [et al.], *SLC45A2*: a novel malignant melanoma associated gene, *Human Mutation* 2008, 29, 1161–1167.

30. Fisher R. A., The correlation between relatives on the supposition of Mendelian inheritance, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 1918, 52, 399–433.
31. Flanagan N., Healy E., Ray A. [et al.], Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene on human pigmentation, *Human Molecular Genetics* 2000, 9, 2531–2537.
32. Frudakis T., Thomas M., Gaskin Z. [et al.], Sequences associated with human iris pigmentation, *Genetics* 2003, 165, 2071–2083.
33. 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.
34. García-Borrón J. C., Sánchez-Laorden B. L., Jiménez-Cervantes C., Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation, *Pigment Cell Research* 2005, 18, 393–410.
35. Gorroochurn P., Hodge S. E., Heiman G. A. [et al.], Non-replication of association studies: “pseudo-failures” to replicate?, *Genetics in Medicine* 2007, 9, 325–331.
36. Graf J., Voisey J., Hughes I. [et al.], Promoter polymorphisms in the MATP (*SLC45A2*) gene are associated with normal human skin colour variation, *Human Mutation* 2007, 28, 710–717.
37. 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.
38. 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.
39. Grnskov K., Ek J., Brondum-Nielsen K., Oculocutaneous albinism, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2007, 2, 43.
40. Gudbjartsson D. F., Sulem P., Stacey S. N. [et al.], *ASIP* and *TYR* pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma, *Nature Genetics* 2008, 40, 886–891.
41. Hahn L.W., Ritchie M. D., Moore J. H., Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions, *Bioinformatics* 2003, 19, 376–382.
42. Han J., Kraft P., Nan H. [et al.], A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation, *Public Library of Science Genetics* 2008, 4, e1000074.
43. Harding R. M., Healy E., Ray A. J. [et al.], Evidence for variable selective pressures at *MC1R*, *American Journal of Human Genetics* 2000, 66, 1351–1361.
44. Healy E., Jordan S. A., Budd P. S. [et al.], Functional variation of *MC1R* alleles from red-haired individuals, *Human Molecular Genetics* 2001, 10, 2397–2402.
45. Hedges D. J., Walker J. A., Callinan P.A. [et al.], Mobile element-based assay for human gender determination, *Analytical Biochemistry* 2003, 312, 77–79.
46. Hirschhorn J. N., Lohmueller K., Byrne E. [et al.], A comprehensive review of genetic association studies, *Genetics in Medicine* 2002, 4, 45–61.
47. Holmes S. J., Loomis H. M., The heredity of eye color and hair color in man, *Biological Bulletin* 1908, 18, 50–65.
48. Höiom V., Tuominen R., Källér M. [et al.], *MC1R* variation and melanoma risk in the Swedish population in relation to clinical and pathological parameters, *Pigment Cell and Melanoma Research* 2008, 10.1111/j.1755-148X.2008.00526.x
49. Hurst C. C., On the inheritance of eye colour in man, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 1908, 80, 85–96.
50. Imesch P. D., Wallow I. H., Albert D. M., The color of the human eye: a review of morphologic correlates and of some conditions that affect iridial pigmentation, *Survey of Ophthalmology* 1997, 41, 117–123.
51. Inagaki K., Suzuki T., Shimizu H. [et al.], Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan, *American Journal of Human Genetics* 2004, 74, 466–471.
52. Ji Y., Rebert N. A., Joslin J.M. [et al.], Structure of the highly conserved *HERC2* gene and of multiple partially duplicated paralogs in human, *Genome Research* 2000, 10, 319–329.
53. Jimbow K., Oikawa O., Sugiyama S. [et al.], Comparison of eumelanogenesis and pheomelanogenesis in retinal and follicular melanocytes; role of vesiculo-globular bodies in melanosome differentiation, *Journal of Investigative Dermatology* 1979, 73, 278–284.
54. 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 and Prevention* 2004, 13, 808–819.
55. Kanetsky P. A., Rebbeck T. R., Hummer A. J. [et al.] Population-based study of natural variation in the melanocortin-1 receptor gene and melanoma, *Cancer Research* 2006, 66, 9330–9397.
56. 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.
57. Kayser M., Liu F., Janssens A. C. [et al.], Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify *HERC2* as a human iris color gene, *American Journal of Human Genetics* 2008, 82, 411–423.
58. 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.
59. 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.

60. Lalueza-Fox C., Römpler H., Caramelli D. [et al.], A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals, *Science* 2007, 318, 1453–1455.
61. Lamason R. L., Mohideen M. A., Mest J. R. [et al.], SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans, *Science* 2005, 310, 1782–1786.
62. Lander E. S., Linton L. M., Birren B. [et al.], Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 2001, 409, 860–921.
63. Landi M. T., Kanetsky P. A., Tsang S. [et al.], *MC1R*, *ASIP*, and DNA repair in sporadic and familial melanoma in a Mediterranean population, *Journal of the National Cancer Institute* 2005, 97, 998–1007.
64. Lao O., de Gruijter J. M., van Duijn K. [et al.], Signatures of positive selection in genes associated with human skin pigmentation as revealed from analyses of single nucleotide polymorphisms, *Annals of Human Genetics* 2007, 71, 354–369.
65. Lu D., Willard D., Patel I. R. [et al.], Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor, *Nature* 1994, 371, 799–802.
66. Mendel G., Versuche über Pflanzen-Hybriden, Verhandlungen des naturforschenden Vereines, Abhandlungen, *Brünn* 1866, 4, 3–47.
67. Mogil J. S., Wilson S. G., Chesler E. J. [et al.], The melanocortin-1 receptor gene mediates female-specific mechanisms of analgesia in mice and humans, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2003, 100, 4867–4872.
68. Moore J. H., The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases, *Human Heredity* 2003, 56, 73–82.
69. Motokawa T., Kato T., Hashimoto Y. [et al.], Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the *MC1R* gene on freckles and solar lentigines in Japanese, *Pigment Cell Research* 2007, 20, 140–143.
70. Musani S. K., Shriner D., Liu N. [et al.], Detection of gene x gene interactions in genome-wide association studies of human population data, *Human Heredity* 2007, 63, 67–84.
71. Nicholls R. D., Knepper J. L., Genome organization, function, and imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes, *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2001, 2, 153–175.
72. Norton H. L., Kittles R. A., Parra E. [et al.], Genetic evidence for the convergent evolution of light skin in Europeans and East Asians, *Molecular Biology and Evolution* 2007, 24, 710–722.
73. Pastorino L., Cusano R., Bruno W. [et al.], Novel *MC1R* variants in Ligurian melanoma patients and controls, *Human Mutation* 2004, 24, 103.
74. Puri N., Gardner J. M., Brilliant M. H., Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (P) mutant melanocytes, *Journal of Investigative Dermatology* 2000, 115, 607–613.
75. Rana B. K., Hewett-Emmett D., Jin L. [et al.], High polymorphism at the human melanocortin 1 receptor locus, *Genetics* 1999, 151, 1547–1557.
76. Rebbeck T. R., Kanetsky P. A., Walker A. H. [et al.], P gene as an inherited biomarker of human eye color, *Cancer and Epidemiological Biomarkers Prevention* 2002, 11, 782–784.
77. Relethford J. H., Apportionment of global human genetic diversity based on craniometrics and skin color, *American Journal of Physical Anthropology* 2002, 118, 393–398.
78. Reynolds R., Varlaro J., Gender determination of forensic samples using PCR amplification of ZFX/ZFY gene sequences, *Journal of Forensic Sciences* 1996, 41, 279–286.
79. Ritchie M. D., Hahn L. W., Roodi N. [et al.], Multifactor dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen metabolism genes in sporadic breast cancer, *American Journal of Human Genetics* 2001, 69, 138–147.
80. Ritchie M. D., White B. C., Parker J. S. [et al.], Optimization of neural network architecture using genetic programming modeling improves detection and modeling of gene x gene interactions in studies of human diseases, *BioMed Central Bioinformatics* 2003, 28, 4.
81. Robins A. H., Biological perspectives on human pigmentation, Cambridge University Press, Cambridge 2005.
82. Santos F. R., Pandya A., Tyler-Smith C., Reliability of DNA based sex tests, *Nature Genetics* 1998, 18, 103.
83. Sham P. C., Lin M. W., Zhao J. H. [et al.], Power comparison of parametric and nonparametric linkage tests in small pedigrees, *American Journal of Human Genetics* 2000, 66, 1661–1668.
84. Shriver M., Frudakis T., Budowle B., Getting the science and the ethics right in forensic genetics, *Nature Genetics* 2005, 37, 449–450.
85. Sinclair A. H., Berta P., Palmer M.S. [et al.], A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif, *Nature* 1990, 346, 240–244.
86. Slominski A., Wortsman J., Plonka P. M. [et al.], Hair follicle pigmentation, *Journal of Investigative Dermatology* 2005, 124, 13–21.
87. Smit N. P., van Nieuwpoort F. A., Marrot L. [et al.], Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage – study on cultured melanocytes and atypical nevus cells, *Photochemistry and Photobiology* 2008, 84, 550–555.
88. Soejima M., Tachida H., Ishida T. [et al.], Evidence for recent positive selection at the human AIM1 locus in a European population, *Molecular Biology and Evolution* 2006, 23, 179–188.
89. Stokowski R. P., Pant P.V., Dadd T. [et al.], A genome-wide association study of skin pigmentation in a South Asian population, *American Journal of Human Genetics* 2007, 81, 1119–1132.
90. Sturm R. A., A golden age of human pigmentation genetics, *Trends in Genetics* 2006, 22, 464–468.

91. 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 of Sciences* 2003, 994, 348–358.
92. Sturm R. A., Duffy D. L., Zhao Z. Z. [et al.], A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color, *American Journal of Human Genetics* 2008, 82, 424–431.
93. Sturm R. A., Frudakis T. N., Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry, *Trends in Genetics* 2004, 20, 327–332.
94. 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.
95. Sulem P., Gudbjartsson D. F., Stacey S. N. [et al.], Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans, *Nature Genetics* 2008, 40, 835–837.
96. Sulem P., Gudbjartsson D. F., Stacey S. N. [et al.], Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans, *Nature Genetics* 2007, 39, 1443–1452.
97. Sullivan K. M., Mannucci A., Kimpton C. P. [et al.], A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin, *Biotechniques* 1993, 15, 636–638.
98. Templeton A. R., Maxwell T., Posada D. [et al.], Tree scanning: a method for using haplotype trees in phenotype/genotype association studies, *Genetics* 2005, 169, 441–453.
99. Tully G., Genotype versus phenotype: human pigmentation, *Forensic Science International Genetics* 2007, 1, 105–110.
100. 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.
101. 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.
102. Van Gele M., Geusens B., Schmitt A. M., [et al.], Knock-down of myosin Va isoforms by RNAi as a tool to block melanosome transport in primary human melanocytes, *Journal of Investigative Dermatology* 2008, 128, 2474–2484.
103. Vermeulen S. H., Den Heijer M., Sham P. [et al.], Application of multi-locus analytical methods to identify interacting loci in case-control studies, *Annals of Human Genetics* 2007, 71, 689–700.
104. Vink J. M., Boomsma D. I., Gene finding strategies, *Biological Psychology* 2002, 61, 53–71.
105. Voisey J., Gomez-Cabrera Mdel C., Smit D.J. [et al.], A polymorphism in the agouti signalling protein (*ASIP*) is associated with decreased levels of mRNA, *Pigment Cell Research* 2006, 19, 226–231.
106. Wakamatsu K., Hu D. N., McCormick S. A. [et al.], Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides, *Pigment Cell and Melanoma Research* 2008, 21, 97–105.
107. Walkowicz M., Ji Y., Ren X. [et al.], Molecular characterization of radiation and chemically induced mutations associated with neuromuscular tremors, runting, juvenile lethality, and sperm defects in *jdf2* mice, *Mammalian Genome* 1999, 10, 870–878.
108. Weedon M. N., Lettre G., Freathy R. M. [et al.], A common variant of *HMG2* is associated with adult and childhood height in the general population, *Nature Genetics* 2007, 39, 1245–1250.
109. Wehrle-Haller B., The role of Kit-ligand in melanocyte development and epidermal homeostasis, *Pigment Cell Research* 2003, 16, 287–296.
110. Weiner L., Han R., Scicchitano B. M. [et al.], Dedicated epithelial recipient cells determine pigmentation patterns, *Cell* 2007, 130, 932–942.
111. Yuasa I., Umetsu K., Harihara S. [et al.], Distribution of the F374 allele of the *SLC45A2* (*MATP*) gene and founder-haplotype analysis, *Annals of Human Genetics* 2006, 70, 802–811.
112. Yuasa I., Umetsu K., Watanabe G. [et al.], *MATP* polymorphisms in Germans and Japanese: the L374F mutation as a population marker for Caucasoids, *International Journal of Legal Medicine* 2004, 118, 364–366.
113. Zeigler-Johnson C., Panossian S., Gueye S. M. [et al.], Population differences in the frequency of the agouti signaling protein g.8818a>G polymorphism, *Pigment Cell Research* 2004, 17, 185–187.
114. 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

---

## BADANIA NAD PREDYKCJĄ FENOTYPU PIGMENTOWEGO W ASPEKCIE SĄDOWYM

### 1. Wstęp

Cechy pigmentacyjne są dziedziczne, a ich zróżnicowanie jest szczególnie wysokie pomiędzy osobami o różnym pochodzeniu biogeograficznym (ang. biogeographical ancestry, BGA) [77]. Identyfikacja BGA może być przydatna w sprawach kryminalnych, przez co polimorfizm genów pigmentacyjnych stał się przedmiotem badań w naukach sądowych [33, 112]. Kolejnym powodem badań jest możliwość wykorzystania polimorfizmu genów pigmentacyjnych do predykcji fenotypu pigmentowego. Badania tego typu byłyby szczególnie użyteczne w przypadku populacji europejskich, gdzie istnieje zróżnicowanie wewnątrzpopulacyjne pod względem koloru skóry, włosów oraz oczu. W przypadku braku lub niskiej wiarygodności zeznań świadków na temat sprawy przestępstwa, predykcja fenotypu poprzez analizę materiału biologicznego pozostawionego przez przestępcę na miejscu zdarzenia może zawęzić grono osób podejrzanych, ułatwiając pracę śledczym. Predykcja fenotypu pigmentowego mogłaby także być pomocna w antropologii sądowej. Od wielu lat analiza genetyczna każdej próbki podlegającej standardowym badaniom identyfikacyjnym w laboratorium sądowym wiąże się z oznaczeniem płci osoby stanowiącej jej źródło. Wyniki tego prostego testu o 50% redukują populację osób będących przedmiotem zainteresowania organów ścigania w konkretnych przypadkach. Określenie dalszych szczegółów fenotypu sprawcy przestępstwa byłoby z pewnością bardzo użyteczne. Należy jednak zwrócić uwagę na duże znaczenie wiarygodności informacji, które przekazywane są do instytucji prowadzących dochodzenie, gdyż wprowadzenie w błąd organów ścigania może dodatkowo utrudnić prowadzone śledztwo. Praktyczne zastosowanie wiedzy umożliwiającej predykcję cech fenotypowych musi zatem być poprzedzone szczegółowymi badaniami o charakterze asocjacyjnym, funkcjonalnym oraz walidacyjnym [84].

### 2. Determinacja cech pigmentacyjnych człowieka

#### 2.1. Fizyczna determinacja cech pigmentacyjnych

Pigmentacja człowieka jest zdeterminowana przede wszystkim przez ilość, rodzaj oraz rozmieszczenie barwnika melaniny. Barwnik ten jest biopolimerem produkowanym w złożonym procesie biochemicznym zwanym melanogenezą. Jest on wytwarzany w melanocytach – specjalnie przystosowanych do tego komórkach, które powstają z grzebienia nerwowego w drugim miesiącu

życia płodowego człowieka i przedostają się (w formie niedojrzałych melanoblastów) m.in. do skóry oraz przedniej części błony naczyniowej, czyli tęczówki oka. W skórze melanocyty zlokalizowane są w warstwie podstawnej naskórka, a więc tuż nad skórą właściwą. W sumie stanowią zaledwie ok. 5% komórek naskórka, którego głównym elementem są keratynocyty. Część z nich przedostaje się dalej do rozwijających się mieszków włosowych, z których wyrastają trzony włosów. Aktywne melanocyty zlokalizowane są w cebulce włosowej nieco powyżej brodawki włosa i tuż pod populacją keratynocytów tworzących później istotę korową. Melanocyty przedostają się do mieszków włosowych w sposób nieprzypadkowy, dzięki oddziaływaniu receptora c-kit z jego ligandem KITLG znanym również jako czynnik wzrostu komórek pnia (ang. stem cell factor, SCF) wytwarzanym przez komórki cebulki włosowej [81, 86]. Melanocyty z mieszków włosowych różnią się od melanocytów skóry – są większe, mają więcej wypustek dendrytycznych i wytwarzają większe melanosomy [86]. Warto wspomnieć, że melanocyty naskórka oraz melanocyty mieszków włosowych działają w sposób niezależny. Już w 1908 roku Holmes i Loomis odnotowali, że dziedziczenie koloru oczu i włosów jest do pewnego stopnia niezależne [47]. Nietrudno zauważyć, że w populacjach o pochodzeniu europejskim istnieją osobnicy o czarnych włosach i jasnej skórze oraz przeciwnie, jasnych włosach i ciemnej skórze. Z badań przeprowadzonych przez Branickiego i in. (2008) wynika, że 16% osobników badanej populacji polskiej posiadało czarne włosy, a przy tym jasny typ skóry [12]. Robins (2005) przedstawił skrajny przykład Aborygenów, wśród których zdarzają się dzieci posiadające całkowicie jasne włosy, które ciemnieją dopiero w okresie ich dojrzewania. Skóra tych osób pozostaje przy tym ciemna przez całe życie [81].

Proces melanogenezy zachodzi w specjalnych strukturach cytoplazmatycznych melanocytów zwanych melanosomami. W eumelanosomach wytwarzana jest czarno-brązowa odmiana melaniny zwana eumelaniną, natomiast w feomelanosomach powstaje typ czerwono-żółty zwany feomelaniną. Dojrzałe melanosomy są następnie wydzielane do keratynocytów. W przypadku skóry wyodrębnia się tzw. jednostkę melaninową naskórka złożoną z melanocytu oraz kilkudziesięciu keratynocytów, do których trafia wytwarzany pigment. Synteza pigmentu włosów zachodzi w mieszku włosowym [86] w tzw. jednostce pigmentowej mieszków włosowych złożonej z melanocytów, keratynocytów oraz fibroblastów brodawki włosa. Podobnie jak w przypadku skóry, eumelanina i feomelanina wytworzone w melanocytach są transportowa-



ne do keratynocytów, które we włosie tworzą istotę korową oraz istotę rdzenną. Zasadnicza część pigmentu trafia przy tym do kory włosa, w nieco mniejszym stopniu do rdzenia, a nieznaczna tylko ilość do powłoczki trzonu włosa. Proces syntezy pigmentu odbywa się wyłącznie w fazie anagenu, a więc w fazie wzrostu włosa. Wraz z wiekiem obniża się liczba melanocytów w skórze oraz mieszkach włosowych, co w przypadku włosów wiąże się z siwieniem. Co ciekawe, zmniejszająca się liczba melanocytów nie prowadzi do jaśnienia skóry, a wręcz przeciwnie, z wiekiem obserwuje się odwrotną tendencję [81]. W przypadku osobników o pochodzeniu europejskim oraz azjatyckim melanosomy w keratynocytach występują głównie w kompleksach, u osób pochodzenia afrykańskiego natomiast są rozproszone pojedynczo. Wydaje się zatem, że geny odpowiedzialne za tworzenie melanosomów mogą mieć istotne znaczenie w kontekście różnic fenotypu pigmentowego u człowieka.

O kolorze oczu decyduje rozmieszczenie i zawartość melanocytów znajdujących się w błonie naczyniowej oka, a w zasadzie jej przedniej części zwanej tęczęwką [93]. Najbardziej wewnętrzna warstwa tęczęwki, czyli nabłonek pigmentowy tęczęwki składa się z ciasno ułożonych komórek zawierających pigment, ale rozmieszczenie pigmentu w tej warstwie jest jednakowe u osób posiadających różny kolor oczu. Zewnętrzna warstwa tęczęwki, czyli warstwa przednia zrębu tęczęwki złożona jest z tkanki łącznej, fibroblastów oraz melanocytów zawierających melaninę zgromadzoną w melanosomach. To właśnie ta warstwa ma, jak się przyjmuje, decydujące znaczenie dla koloru oczu [50]. Nie stwierdzono różnic co do liczby samych melanocytów w przypadku poszczególnych kolorów oczu. Wykazano natomiast, że różnice związane są z liczbą melanosomów i ilością oraz rodzajem samego pigmentu, a więc z aktywnością melanocytów. Wakamatsu i in. (2008) wykazali, że w przypadku jasnego koloru oczu ilość eumelaniny jest niższa niż w przypadku ciemniejszego koloru oczu. Odwrotny, choć nieznaczący statystycznie efekt, uzyskano dla feomelaniny [106]. Osobnicy albinotyczni w ogóle nie posiadają pigmentu, a ich oczy mogą się wydawać różowe za sprawą światła odbijającego się od naczyń krwionośnych.

## 2.2. Podstawowe geny związane z procesem melanogenezy

Synteza pigmentu jest złożonym procesem biochemicznym, w który zaangażowanych jest wiele białek enzymatycznych, strukturalnych, regulatorowych, transportujących, receptorowych oraz ich ligandów. Jak napisano wcześniej, melanogeneza zachodzi w strukturach melanocytów podobnych do lizosomów zwanych eumelanosomami oraz feomelanosomami. Dojrzałe eumelanosomy różnią się od feomelanosomów elipsoidalnym kształtem (feomelanosomy mają kształt sferyczny) i blaszko-

watą strukturą (ang. lamellae) [53]. Wiadomo, że melani-na będąca silnym akceptorem elektronów może neutralizować wolne rodniki i zabezpieczać w ten sposób komórki przed uszkodzeniem DNA [81]. Zasadniczo nie ma wątpliwości co do tego, że eumelanina ma charakter fotoprotekcyjny. Z niektórych badań wynika natomiast, że feomelanina może działać przeciwnie, uwrażliwiając tkanki na działanie promieni UV oraz powstających wolnych rodników, choć efekt ten może również być wywołany pośrednio poprzez obniżenie poziomu cysteiny w związku z samą syntezą feomelaniny [1, 87, 101]. Pierwszy etap syntezy obu form melaniny jest katalizowany przez tyrozynazę (TYR) stanowiącą w związku z tym kluczowy enzym procesu melanogenezy. Etap ten polega na podwójnym utlenianiu tyrozyny, w wyniku czego powstaje dopachinon. Kolejne etapy są już odmienne dla szlaku syntezy eumelaniny i feomelaniny. Do syntezy tej drugiej niezbędna jest obecność jeszcze jednego aminokwasu – cysteiny (rycina 1). Istotną rolę w procesie melanogenezy pełni produkt genu *MC1R* – receptor siedmiokrotnie przechodzący przez błonę melanocytu związany z białkiem G. Po jego aktywacji przez hormon melanotropowy -MSH dochodzi do wzrostu stężenia c-AMP i pozytywnej regulacji syntezy eumelaniny. U myszy antagonistą receptora *Mc1r* jest produkt genu *Asip*, który pozytywnie reguluje syntezę feomelaniny. Istnieją prace, które sugerują podobną rolę genu *ASIP* u człowieka [5, 56]. Jak dotąd poznano również funkcję kilku innych genów związanych z procesem melanogenezy i dystrybucji pigmentu. Gen *SLC45A2* jest prawdopodobnie odpowiedzialny za transport i wewnątrzkomórkowe przetwarzanie tyrozynazy [21]. Produkt genu *OCA2* jest integralnym białkiem błony melanosomu odpowiedzialnym za transport anionów, a więc regulację pH wewnątrz melanosomów [74]. Geny *SLC24A5*, *SLC24A4* i *TPCN2* należą do grupy transporterów wapnia, którego stężenie ma istotne znaczenie dla procesu melanogenezy oraz rozwoju melanosomów [61, 96]. *KITLG* kodujący ligand receptora kinazy tyrozynowej *KIT* ma znaczenie z punktu widzenia migracji i rozwoju melanocytów [109]. Gen *MYO5A* jest zaangażowany w proces transportu melanosomów. Geny *TYRP1* oraz *DCT* (znany również jako *TYRP2*) są zaangażowane w szlak syntezy eumelaniny. Typ (eumelanina, feomelanina), ilość oraz rozmieszczenie melaniny ma decydujące znaczenie dla koloru skóry, oczu oraz włosów, a więc mutacje w wymienionych genach mogą mieć istotny wpływ na pigmentację.

## 3. Mapowanie genetyczne

Mapowanie genetyczne prowadzi się w oparciu o dwie podstawowe metody, tj. analizę sprzężeń oraz badania asocjacyjne [104]. Pierwsza z nich jest stosowana

od bardzo wielu lat i dobrze sprawdza się zwłaszcza przy poszukiwaniu genów odpowiedzialnych za determinację cech o dużym stopniu penetracji (wysokim odsetku osobników posiadających określony wariant, u których występuje dana cecha) i dziedziczeniu recesywnym. Druga metoda uzyskała duże znaczenie w ostatnich latach, stając się szczególnie użyteczną do analizy cech złożonych. Obie metody polegają na wykorzystaniu zjawiska genetycznego zwanego nierównowagą sprzężeń (ang. linkage disequilibrium) przejawiającego się istnieniem haplotypów, a więc wspólnym dziedziczeniem segmentów chromosomów. Do przeprowadzenia obu analiz konieczne jest zastosowanie markerów genetycznych o zdefiniowanej lokalizacji w genomie człowieka. Analiza sprzężeń prowadzona jest najczęściej w oparciu o charakteryzujące się wysokim polimorfizmem sekwencje mikrosatelitarne, a badania asocjacyjne o polimorfizmy typu SNP.

W przypadku analizy sprzężeń próbki badawcze pochodzą od członków rodzin, z których więcej niż jeden posiada analizowany efekt fenotypowy (może to być określona choroba lub cecha fizjologiczna). W przypadku cech o prostym dziedziczeniu mendelowskim można stosować standardową metodę analizy sprzężeń znaną jako metoda parametryczna. Jej zastosowanie wiąże się z określeniem modelu genetycznego, w którym konieczne należy uwzględnić m.in. sposób dziedziczenia. Zdefiniowanie modelu genetycznego jest jednak trudne lub niemożliwe w przypadku cech poligenicznych. Wtedy stosuje się inny wariant analizy sprzężeń zwany nieparametrycznym [23, 83]. W praktyce powszechnie stosowanym rozwiązaniem jest genotypowanie rodzeństwa, u którego pojawia się badany fenotyp. Celem badań jest odnalezienie markera genetycznego segregującego w rodzinie w ten sam sposób jak badana cecha fenotypowa. Odnalezienie takiego markera pozwala następnie na przyjęcie założenia, że w jego pobliżu znajduje się pozycja polimorficzna mająca znaczenie funkcjonalne. Rozdzielczość tej metody nie jest duża, co wiąże się z koniecznością prowadzenia dalszych szczegółowych badań pozwalających na ostateczne odnalezienie *locus* odpowiedzialnego za determinację określonej cechy. To właśnie analiza sprzężeń pozwoliła między innymi na ustalenie, że *loci* związane z dziedziczeniem koloru oczu są zlokalizowane w określonym obszarze chromosomu 15 [27].

Ogólna zasada badań asocjacyjnych jest również prosta, analizę prowadzi się dla dwóch grup osób niespokrewnionych, z których pierwsza posiada efekt fenotypowy, a druga stanowi tzw. grupę kontrolną, bez efektu. Wykazanie, że jeden z alleli jest statystycznie częstszy w grupie osobników posiadających badany efekt fenotypowy niż w grupie kontrolnej pozwala na przyjęcie hipotezy, że w obszarze, w którym położony jest marker, może znajdować się *locus* odpowiedzialny za determinację analizowanej cechy. Istotność statystyczną różnic częstości można wykazać na przykład za pomocą pro-

stego testu <sup>2</sup> lub metod regresji. Zastosowanie tej drugiej metody umożliwia testowanie modeli uwzględniających wiele zmiennych. Metody statystyczne znajdujące zastosowanie przy analizach asocjacyjnych w przystępny sposób przedstawił Balding (2006) [3]. Mimo, że rozdzielczość badań asocjacyjnych jest wyższa niż w przypadku analizy sprzężeń, to w przeszłości zastosowanie metody badań asocjacyjnych musiało być ograniczone względami technicznymi do wyselekcjonowanych obszarów chromosomów (badania asocjacyjne tzw. genów kandydujących) [46]. Mogły one wtedy stanowić kolejny etap na drodze do identyfikacji genu, a nawet konkretnego polimorfizmu odpowiedzialnego za determinację badanej cechy. Badania asocjacyjne, w których skoncentrowano się na regionie wskazanym przez uprzednią analizę sprzężeń, pozwoliły na precyzyjną identyfikację dwóch polimorfizmów w genie *OCA2* zlokalizowanym w chromosomie 15 związanych z dziedziczeniem koloru oczu [76]. Obecnie, kiedy możliwa jest jednoczesna analiza setek tysięcy markerów, nie ma przeszkód, aby metodę badań asocjacyjnych stosować również w charakterze przesiewowym (w zastępstwie lub w połączeniu z analizą sprzężeń) [np. 57]. Badania tego typu nazywa się badaniami asocjacyjnymi w skali całego genomu (ang. genome wide association studies, GWAS). Polegają one na analizie około 300 tysięcy (obecnie nawet ponad 900 tysięcy; [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) pozycji typu SNP regularnie rozmieszczonych w całym genomie i pozwalają na wykrycie regionów, które wykazują związki z badaną cechą fenotypową. Badania prowadzi się z zastosowaniem techniki mikromacierzy DNA ([www.illumina.com](http://www.illumina.com); [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). Badania asocjacyjne stanowią skuteczną metodę mapowania genetycznego również w przypadku alleli o niskiej penetracji związanych z cechami o dziedziczeniu wielogenowym [np. 42, 96, 108].

#### 4. Geny związane z pigmentacją człowieka

##### 4.1. Identyfikacja genów związanych z pigmentacją człowieka

Większość cech fenotypowych człowieka to cechy o charakterze poligenicznym. Poznanie sekwencji DNA człowieka [62] umożliwiło szybki wzrost liczby danych dotyczących zmienności charakterystycznej dla populacji o różnym pochodzeniu biogeograficznym. Ułatwiło to prowadzenie różnego typu badań, m.in. nad presją selekcyjną działającą na różne obszary genomu człowieka oraz korelacją pomiędzy poszczególnymi wariantami genetycznymi a różnego typu cechami złożonymi. Możliwe stało się bardziej efektywne odnajdywanie regionów DNA związanych z efektem fenotypowym oraz ustalanie tak zwanych genów kandydujących o potencjalnie istotnej roli w determinacji cech. Z dwóch podstawowych metod

mapowania genetycznego bardziej użyteczna w kontekście cech o dziedziczeniu wielogenowym (o średnim lub słabym efekcie fenotypowym) jest metoda badań asocjacyjnych. Szczególne sukcesy odnosi (także w kontekście cech pigmentacyjnych) metoda badań asocjacyjnych GWAS. Jak wspomniano wcześniej, synteza i dystrybucja pigmentu jest złożonym procesem biochemicznym i komórkowym. Przypuszcza się, że naturalna zmienność cech pigmentacyjnych może pozostawać pod kontrolą aż 127 genów [9]. Jak dotąd lepiej poznano zaledwie kilka z nich. Identyfikację niektórych genów zaangażowanych w proces pigmentacji ułatwiły ich związki z dziedziczeniem skrajnych fenotypów pigmentowych, np. albinizmu oczno-skórnego. Dziedziczenie to ma charakter mendelowski i jest przez to stosunkowo proste do badania. Brak funkcjonalności jednego tylko genu sprawia, że przerwany zostaje istotny szlak metaboliczny, co uniemożliwia lub znacznie ogranicza syntezę pigmentu. Dotychczas opisano cztery geny odpowiedzialne za różne formy albinizmu oczno-skórnego u człowieka [39]. Gen tyrozynazy (*TYR*; MIM: 606933) jest odpowiedzialny za dwie różne formy albinizmu, w tym najcięższą, tj. *OCA1A* (ang. oculocutaneous albinism type 1A). Druga forma *OCA1B* jest nieco łagodniejsza, a u pacjentów może pojawić się po pewnym czasie niewielka ilość pigmentu. Łagodniejsza postać kliniczna związana jest również z mutacjami wywołującymi albinizm typu *OCA2* (gen *OCA2*; MIM: 611409) oraz *OCA4* (gen *SLC45A2*; MIM: 606202). Albinizm typu *OCA3* wywołany jest mutacjami w genie *TYRPI* (ang. tyrosinase related protein 1; MIM: 115501) i przejawia się rudym kolorem włosów oraz rudawym odcieniem skóry u Afrykanów [39]. Skoro produkty tych genów pełnią tak kluczowe funkcje w procesie syntezy melaniny, to wydaje się, że logiczne jest uznanie ich za geny kandydujące w badaniach nad naturalnym zróżnicowaniem pigmentacji człowieka.

#### 4.2. Geny wykazujące korelację z fizjologiczną zmiennością cech pigmentacyjnych

W tabeli I przedstawiono geny, dla których odnotowano związki z fenotypem pigmentowym człowieka. Pierwszym i najlepiej jak dotąd zbadanym genem o istotnym znaczeniu dla naturalnej zmienności pigmentacji człowieka jest gen *MC1R* (MIM: 155555). Jest on złożony z pojedynczego eksonu o długości 951 pz kodującego białko receptora dla melanokortyny typu 1. W 1995 roku Valverde i in. przeanalizowali zmienność sekwencji genu *MC1R* odnotowując, że zmutowane allele przede wszystkim pojawiają się u osobników o rudym kolorze włosów oraz jasnej skórze [101]. Podobne badania przeprowadzono następnie dla wielu populacji na świecie, potwierdzając tamte wnioski [11, 13, 43, 54, 73, 75]. Gen *MC1R* jest głównym genem odpowiedzialnym za determinację fenotypu przejawiającego się rudym kolorem włosów

oraz jasną skórą, który określono mianem fenotypu RHC (ang. red hair colour). W genie *MC1R* opisano ponad 60 miejsc polimorficznych niesynonimicznych lub nonsensownych [34]. Wśród nich wyróżniono dwie istotne z punktu widzenia predykcji fenotypu grupy mutacji, które oznaczono jako R – o istotnej roli w determinacji fenotypu RHC – oraz r, o niższym stopniu korelacji z tym fenotypem [55, 91]. Pierwotna lista wariantów oznaczonych jako R ograniczała się do czterech pozycji typu SNP, tj. rs1805006 (D84E), rs1805007 (R151C), rs1805008 (R160W) oraz rs1805009 (D294H). Została ona rozszerzona o warianty rs11547464 (R142H), rs1110400 (I155T) oraz wszystkie mutacje o charakterze nonsensownym, np. 86insA. Wśród pozycji r wyróżnia się rs1805005 (V60L), rs2228479 (V92M) oraz rs885479 (R163Q). Badania funkcjonalne, które przeprowadzono dla najistotniejszych polimorfizmów związanych z fenotypem RHC potwierdziły, że mutacje R142H, R151C, R160W i D294H prowadzą do obniżenia efektywności działania receptora (ang. diminished function mutations) [8, 44]. Nie do końca jasny jest mechanizm działania tych mutacji i jak się wydaje, może on być różny w przypadku różnych polimorfizmów. Rzeczywiście, dla alleli V60L, D84E, R151C, I155T, R160W i R163Q zaobserwowano znacząco obniżoną ekspresję receptora na powierzchni komórek, a efekt ten nie występował dla alleli R142H i D294H. Wykazano, że w przypadku pierwszej grupy mutacji obniżenie wydajności syntezy cAMP jest proporcjonalne do niższej ekspresji w błonie komórkowej. W przypadku dwóch pozostałych mutacji efekt ten może być wywołany słabszym wiązaniem białka G lub słabszym powinowactwem do agonisty receptora, czyli hormonu  $\alpha$ -MSH [7, 8]. Potwierdzono, że fenotyp RHC w dużej mierze dziedziczony jest w sposób recesywny, lecz jednocześnie efekt mutacji w genie *MC1R* jest ilościowy, a więc osoby posiadające już jeden zmutowany allel mają z reguły jaśniejszą skórę, zaś jego efekt może również manifestować się na przykład poprzez częściowo rude włosy w zaroście u mężczyzn czy też poprzez obecność piegów [31, 91]. Nieliczne heterozygoty R/0 (jeden allel niezmutowany) mogą również charakteryzować się fenotypem RHC. Związek mutacji w genie *MC1R* z piegami potwierdzono nie tylko dla populacji europejskiej [5], ale także azjatyckiej [69]. Praktyczną użyteczność analizy polimorfizmu genu *MC1R* potwierdzono w pracach o charakterze sądowym [16, 38]. Homozygoty posiadające dwa zmutowane allele R oraz złożone heterozygoty R/R w zdecydowanej większości przypadków posiadają fenotyp RHC. Ze względu na względnie wysoką częstość w populacji najważniejsze z punktu widzenia dziedziczenia fenotypu RHC są pozycje R151C oraz R160W. Te dwa miejsca polimorficzne oraz pozostałe pozycje R mają duże znaczenie predykcyjne, zwłaszcza w populacjach zamieszkujących Europę północną. W populacji polskiej około 97% osób

o genotypach 151C/151C, 160W/160W, 151C/160W posiadało rudy kolor włosów [13]. W Wielkiej Brytanii (a zwłaszcza w Irlandii), gdzie odsetek osób o fenotypie RHC jest znaczący, analizę zmienności tego genu zastosowano w niektórych przypadkach sądowych, uzyskując w ten sposób ważne dane o charakterze operacyjnym, które pozwoliły na ukierunkowanie prowadzonego śledztwa [99]. Pastorino i in. (2004) zbadali populację włoską, odnotowując przypadki, w których osoby o dwóch zmutowanych allelach R nie posiadały charakterystycznego fenotypu RHC. Nasuwa się wniosek, że w populacjach o ciemniejszej pigmentacji efekt genu *MC1R* może być maskowany przez inne geny [73]. Nie potwierdzono jednoznacznie wpływu mutacji w genie *MC1R* na kolor oczu. Większość badań wskazuje jednak, że mutacje w tym genie nie wpływają na kolor tęczówki oka u człowieka [13, 31, 32]. Gen *MC1R* z pewnością wykazuje efekt plejotropowy. Udowodniono jego rolę w dziedziczeniu predyspozycji do nowotworów skóry, w tym czerniaka złośliwego [np. 17, 100]. Przeważa przy tym obecnie pogląd, że jest to rola niezależna od wpływu na sam fenotyp pigmentowy [55]. Wykazano również związek mutacji w genie *MC1R* z odczuwaniem bólu u kobiet [67]. Jako ciekawostkę można odnotować, że polimorfizm genu *MC1R* zbadano także w kopalnych szczątkach Neandertalczyka. Badania wykazały istnienie polimorfizmu (niespotykanego u człowieka współczesnego), który należałoby zaliczyć do mutacji odpowiedzialnych za determinację fenotypu RHC. Wyniki wskazują, że Neandertalczycy, podobnie jak przedstawiciele *Homo sapiens*, mogli charakteryzować się zróżnicowaniem fenotypu pigmentowego, co stanowiłoby przykład równoległej ewolucji tych dwóch form ludzkich [60].

Krude i in. (1998) opisali mutację w trzecim eksonie genu *POMC* (MIM: 176830) prowadzącą do jego przedwczesnej terminacji i w efekcie braku produktów ekspresji: hormonu adrenokortykotropowego ACTH, hormonu melanotropowego -MSH oraz -endorfiny. Oprócz różnych nieprawidłowości pacjenci charakteryzowali się także fenotypem RHC, co potwierdziło kluczowe znaczenie aktywacji receptora *MC1R* przez pełniący rolę jego agonisty hormon -MSH dla procesu syntezy eumelaniny [59]. Niedawno Höiom i in. (2008) opisali nowe mutacje w genie *POMC* u osób o fenotypie RHC, którzy nie posiadali mutacji w genie *MC1R*, możliwe więc, że gen ten jest istotniejszym determinantem rudego koloru włosów niż pierwotnie sądzono. Problem ten wymaga jednak dalszych badań [48]. Innym genem, który może być odpowiedzialny za determinację fenotypu RHC, jest gen *ASIP* (MIM: 600201). Badania nad modelem mysim dowiodły, że produkt genu *Asip* jest naturalnym antagonistą receptora *Mc1r* [65]. Ludzki gen *ASIP* złożony jest z trzech eksonów podlegających translacji, które kodują białko o długości 132 aminokwasów. Kanetsky i in. (2002) zbadali zmienność genu *ASIP* i wy-

kazali związek pozycji rs6058017 (A8818G) w regionie niepodlegającym translacji na końcu 3' (3'UTR) z fenotypem pigmentowym człowieka [56]. W populacji zbadanej przez nich allel G wykazywał korelację z ciemniejszym kolorem włosów oraz oczu. Zaproponowali oni mechanizm uwzględniający rolę regionu 3'UTR w stabilizacji mRNA, zgodnie z którym allel G miałby prowadzić do destabilizacji transkryptu, co obniżałoby stężenie antagonisty *ASIP*, a w konsekwencji pozytywnie regulowało syntezę eumelaniny. Obniżone stężenie mRNA dla allelu G zostało potwierdzone eksperymentalnie przez Voisey i in. (2006). Grupa ta wykazała również statystycznie istotne różnice w częstościach alleli A i G w populacjach Europejczyków i u Aborygenów oraz potwierdziła związek allelu G z ciemniejszym kolorem włosów u osób o pochodzeniu europejskim [105]. Różnice częstości alleli pomiędzy osobnikami wywodzącymi się z Europy, Azji i Afryki wykazali wcześniej Zeigler-Johnson i in. (2004) [113], a potwierdzili także inni [10]. Nie we wszystkich populacjach potwierdzono jednak związek allelu 8818G z ciemniejszą pigmentacją [17, 32, 63]. Wyniki szerokich badań przeprowadzonych przez Nortona i in. (2007) wskazują, że różnice w częstościach polimorfizmu A8818G odzwierciedlają raczej podział na populacje afrykańskie i nieafrykańskie, a nie na populacje o jaśniejszej i ciemniejszej pigmentacji [72]. Kolejny pośredni dowód na związek genu *ASIP* z fenotypem RHC przedstawili Sulem i in. (2008). Wykazali oni związek haplotypu w regionie, w którym zlokalizowany jest gen *ASIP* (pozycje rs1015362 i rs4911414) z rudym kolorem włosów, piegami oraz wrażliwością na poparzenia słoneczne [95]. Ta sama grupa badawcza stwierdziła również związek tych pozycji z podatnością na nowotwory skóry [40].

Gen *OCA2*, poza wspomnianą powyżej rolą w dziedziczeniu albinizmu oczno-skórnego, jest jednym z istotnych genów kształtujących zmienność koloru tęczówki oka u człowieka. Na początku 20. wieku, kiedy zrozumiano znaczenie prac Grzegorza Mendla dotyczących reguły dziedziczenia [66], zmienność w kolorze oczu próbowano wyjaśnić za pomocą genetyki mendlowskiej [22, 49]. Dziś wiadomo, że kolor oczu to cecha o charakterze poligenicznym. Analiza sprzężeń przeprowadzona przez Eiberga i in. (1996) wykazała, że za determinację fizjologicznej zmienności w kolorze oczu odpowiedzialne są co najmniej trzy *loci* [27] – zlokalizowany w chromosomie 19 *locus*, który oznaczono EYCL1 (GEY) oraz dwa *loci* w chromosomie 15, tj. EYCL2 (BEY1) oraz EYCL3 (BEY2). Eiberg i in. (1996) zasugerowali także, że za *locus* EYCL3 może kryć się gen *OCA2* znany wtedy jako gen P. Gen *OCA2* jest złożony z 24 eksonów, które kodują białko o długości 838 aminokwasów wchodzące w skład błony komórkowej melanosomu. Rolę genu *OCA2* w dziedziczeniu koloru oczu potwierdzili Rebbeck i in. (2002). Przeprowadzone badania asocjacyjne wy-

kazały, że dwie pozycje niesynonimiczne rs1800401 oraz rs1800407 w tym genie mogą mieć niezależny wpływ na kolor tęczówki oka u człowieka [76]. Frudakis i in. (2003) wyselekcjonowali geny kandydujące i przeanalizowali 754 polimorfizmy typu SNP zarówno w obrębie znanych genów pigmentacyjnych, jak również w innych miejscach genomu, w tym w genach odpowiedzialnych za metabolizm ksenobiotyków. Badania te potwierdziły istotną rolę w determinacji koloru oczu obszaru chromosomu 15, na którym zlokalizowany jest gen *OCA2* [32]. Mapowanie genetyczne metodą analizy sprzężeń przeprowadzone przez Zhu i in. (2004) również wskazało na ten sam obszar genomu człowieka. Na podstawie uzyskanych wyników badań zasugerowano, że za około 70% zmienności w kolorze oczu u człowieka odpowiada jeden gen, tj. *OCA2* [114]. Dalsze badania prowadzone nad genem *OCA2* wykazały, że istotną rolę dla pigmentacji odgrywają trzy pozycje nukleotydowe zlokalizowane w intronie 1 [25], co wskazywało na istotną rolę regulacji ekspresji genu *OCA2* w determinacji tej cechy. Branicki i in. (2008) przeanalizowali kilkanaście pozycji SNP w genie *OCA2* i stosując metodę skanowania drzew filogenetycznych [98], uwzględniającą genealogiczne pokrewieństwo pomiędzy haplotypami wykazali, że jedna pozycja, tj. niesynonimiczna zmiana rs1800407 (R419Q) ma istotne znaczenie w determinacji koloru oczu. Badania potwierdziły również wcześniejsze wyniki sugerujące związek tej mutacji z zielonym kolorem oczu. Wykazano przy tym też, że polimorfizm ten odpowiada za zaledwie 4% zmienności w kolorze tęczówki oka charakterystycznej dla badanej populacji [14]. Ponieważ w badaniach uwzględniono wszystkie niesynonimiczne zmiany w genie *OCA2* charakteryzujące się istotnym poziomem częstości, taki wynik pośrednio potwierdził sugerowaną przez Duffy'ego i in. (2007) rolę regulacji ekspresji genu w determinacji zmienności tęczówki oka. Sulem i in. (2007), analizując wyniki swoich szerokich badań typu GWAS, sformułowali hipotezę, że w tym regionie genomu dla determinacji fenotypu pigmentowego kluczowe znaczenie może mieć efekt interakcji pomiędzy dwoma sąsiadującymi genami *HERC2* (MIM: 605837) oraz *OCA2* [96]. Gen *HERC2* był wcześniej wiązany z syndromami Angelmana i Pradera-Williego, w których często obserwuje się hypopigmentację [71], a ponadto jego interakcję z genem *OCA2* postulowano w związku z badaniami prowadzonymi na myszach [107].

*HERC2* jest dużym genem złożonym z 93 eksonów, o bardzo konserwatywnej strukturze, kodującym białko o długości 4834 aminokwasów [52]. Poza tym niewiele niestety wiadomo na temat funkcji genu *HERC2*. W 2008 roku dwie niezależne grupy badaczy niemal jednocześnie wykazały, że gen *HERC2* może pełnić funkcję regulatorową względem genu *OCA2* [57, 92]. Wydaje się przy tym, że Sturm i in. (2008) odnaleźli polimorfizm, który może mieć efekt funkcjonalny. Pozycja polimor-

ficzna rs12913832 położona jest w konserwatywnym intronie 86 genu *HERC2*, w którym znajdują się miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych [92]. Eiberg i in. (2008) przedstawili wyniki badań eksperymentalnych o charakterze funkcjonalnym, które wskazują, że sekwencja w obszarze pozycji rs12913832 może pełnić rolę wygaszacza ekspresji. Test mobilności (ang. mobility shift assay) wykazał, że dwa allele w tej pozycji mają różne powinowactwo względem czynników białkowych, a więc mogą z różną siłą wiązać czynniki transkrypcyjne [28]. Branicki i in. (2009) przeanalizowali pięć postulowanych kluczowych pozycji dla dziedziczenia niebieskiego lub brązowego koloru oczu w genach *OCA2* oraz *HERC2* i poprzez wieloczynnikową regresję logistyczną oraz analizę haplotypów wykazali, że największe znaczenie ma SNP rs12913832. Badania wykazały, że efekt tej pozycji nie jest ograniczony do koloru oczu, ale również ma ona wpływ na pozostałe cechy pigmentowe. Potwierdziły one także spostrzeżenie m.in. Holmes i Loomis z 1908 roku [47] na temat recesywnego charakteru alleli odpowiedzialnych za determinację jaśniejszych cech pigmentacyjnych [15]. Z przeprowadzonych badań wynika również, że pozycja rs1800407 w genie *OCA2* pozostaje w niezależny sposób związana z dziedziczeniem koloru oczu, pełniąc rolę modulującą względem pozycji rs12913832 w genie *HERC2* [15, 92]. Analiza polimorfizmu rs12913832 pozwala na predykcję koloru tęczówki oka na bardzo ogólnym poziomie niebieski – brązowy. Konieczne są dalsze badania, które powinny zwiększyć wiarygodność oraz precyzję przyszłego testu do predykcyjności koloru oczu, wydaje się jednak, że jest to kolejna cecha, która już niedługo może podlegać wiarygodnej analizie predykcyjnej.

Gen *SLC45A2* znany również jako MATP (ang. membrane associated transporter protein) należy do genów o dobrze udokumentowanej roli w determinacji naturalnej zmienności fenotypu pigmentowego człowieka. Gen złożony jest z siedmiu eksonów i koduje białko o długości 530 aminokwasów. Jak napisano wcześniej, pewne mutacje w genie *SLC45A2* są odpowiedzialne za albinizm oczno-skróny typu 4, który, co ciekawe, stanowi najczęściej obserwowaną formę albinizmu w populacji japońskiej [51]. Odnotowano, że polimorfizm rs16891982 (L374F) może być użyteczny do analizy pochodzenia biogeograficznego [111, 112]. Wykazano również, że locus *SLC45A2* pozostawał pod wpływem działania doboru pozytywnego [np. 64, 88]. Graf i in. (2005) wykazali korelację dwóch niesynonimicznych polimorfizmów w eksonach 3 oraz 5 z naturalną zmiennością koloru skóry, włosów oraz oczu u ludzi pochodzenia europejskiego. Stwierdzono jednak, że pozycje rs26722 (E272K) i rs16891982 (L374F) są sprzężone genetycznie. Wywołało to wątpliwości co do ich niezależnego wpływu na cechy pigmentacyjne [37]. Han i in. (2008) stwierdzili, że pozycja rs16891982 jest związana z kolo-

rem skóry oraz włosów, a także wrażliwością na poparzenia słoneczne [42]. Również Fernandez i in. (2008) odnotowali, że allel L374 statystycznie częściej występuje u osób z ciemniejszą pigmentacją, a co więcej, pełni rolę ochronną przed nowotworami skóry [29]. Branicki i in. (2008) odnotowali korelację ancestralnego allelu L374 wyłącznie z ciemniejszym kolorem włosów, a nie zaobserwowali związku z kolorem skóry oraz oczu. Taki rezultat może wynikać z niewielkich rozmiarów badanej próby populacyjnej w połączeniu z niską częstością tego allelu w badanej populacji. Brak powtarzalności wyników badań asocjacyjnych jest zjawiskiem dosyć często spotykanym i może wynikać również m.in. z różnic międzypopulacyjnych w częstościach alleli oraz struktury sprzężenia genetycznego, ukrytej substruktury populacji, a także interakcji genetycznych [35, 68]. Z przeprowadzonych dotąd badań asocjacyjnych nad polimorfizmami rs26722 i rs16891982 wynika, że prawdopodobnie tylko drugi jest związany z determinacją fenotypu pigmentowego, a efekt pierwszej mutacji jest wynikiem sprzężenia [12, 37, 42]. Także Soejima i in. (2006) po przeprowadzonej analizie nad ewolucyjnym stanem alleli w tych pozycjach nukleotydowych zasugerowali, że efekt fenotypowy związany jest wyłącznie z pozycją rs16891982 [88]. Stokowski i in. (2007) wykazali, że gen *SLC45A2* (polimorfizm rs16891982) wykazuje korelację z kolorem skóry w populacji południowoazjatyckiej [89]. Sugerowana przez Graf i in. (2007) rola sekwencji promotorowych genu *SLC45A2* w determinacji fenotypu pigmentowego [36] nie została jak dotąd potwierdzona w innych populacjach [26, 42].

Gen *SLC24A5* znany również jako *NCKX5* (MIM: 609802) jest uważany za jeden z najważniejszych genów odpowiedzialnych za determinację jasnego koloru skóry charakterystycznego dla populacji europejskiej [61, 90]. Jak oszacowano, gen ten odpowiada za co najmniej 25% zróżnicowania w kolorze skóry pomiędzy Europejczykami a Afrykanami, co rzeczywiście stawia go w czołowie pod względem rozmiarów efektu fenotypowego. Gen *SLC24A5* jest złożony z dziewięciu eksonów i koduje białko o długości 500 aminokwasów. Jego produkt prawdopodobnie odpowiada za dojrzewanie melanosomów, a więc istotny element procesu tworzenia i dystrybucji pigmentu. Przypomnijmy, że istnieją istotne różnice pod względem rozmiaru melanosomów dla populacji europejskiej i afrykańskiej. Lamason i in. (2005) wykazali, że polimorfizm rs1426654 (A111T) w eksonie 3 jest związany z naturalną zmiennością w kolorze skóry u człowieka. Częstość allelu ancestralnego A111 osiąga niemal 100% w populacjach afrykańskich i azjatyckich, podczas gdy allel 111T występuje z niemal 100% częstością w populacjach pochodzenia europejskiego [19, 61]. Z wspomnianych już wcześniej badań przeprowadzonych przez Stokowskiego i in. (2007) nad populacją południowoazjatycką wynika, że poza polimorfizmem

w genie *SLC45A2* istotną rolę w determinacji zróżnicowania koloru skóry w tym regionie świata odgrywają dwa inne geny, jednym z nich jest właśnie gen *SLC24A5* (rs1426654), drugi to gen *TYR* (polimorfizm rs1042602, S192Y). Wykazano, że efekt tych trzech polimorfizmów (genów) jest addytywny i wyjaśnia znaczącą część zmienności w kolorze skóry w populacji południowej Azji [89].

Gen *TYR* jest złożony z pięciu eksonów i koduje białko o długości 529 aminokwasów, które pełni kluczową funkcję w procesie syntezy obu typów melaniny. Rola mutacji w genie *TYR* jest bardzo istotna z punktu widzenia determinacji skrajnego fenotypu pigmentowego znanego jako albinizm oczno-skórny, nie ma natomiast zbyt wielu doniesień na temat związku genu *TYR* z naturalną zmiennością w pigmentacji człowieka. Z szerokich badań asocjacyjnych przeprowadzonych przez Sulem i in. (2007) wynika, że gen *TYR* może mieć związek z dziedziczeniem koloru oczu oraz cech skóry (piegi, wrażliwość na słońce), co wskazuje na jego udział w kształtowaniu naturalnej pigmentacji również w populacjach europejskich [96].

Prace grupy badaczy z Islandii (wspomniana powyżej Sulem i in. 2007 oraz Sulem i in. 2008) pozwoliły na wskazanie genów i regionów genomu, których wcześniej nie brano pod uwagę jako związanych z pigmentacją człowieka [95, 96]. Jednym z takich genów jest *SLC24A4* (MIM: 609840), dla którego wykazano korelację z kolorem oczu oraz włosów. Informacja ta została uwiarygodniona przez Han i in. (2008), którzy potwierdzili istotną korelację genu *SLC24A4* z kolorem włosów i wskazali na możliwy udział w wrażliwości na słońce [42]. Gen *SLC24A4* jest złożony z osiemnastu eksonów kodujących białko o długości 605 aminokwasów należące, podobnie jak produkt genu *SLC24A5*, do grupy transporterów wapnia. Wydaje się, że tę grupę białek należy uznać za szczególnie interesującą z punktu widzenia pigmentacji. Kolejnym transporterem wapnia, który powiązано ze zmiennością pigmentacji u człowieka, jest gen *TPCN2*. Co ciekawe, w przypadku genu *TPCN2* (MIM: 612163) korelację wykazano wyłącznie z kolorem włosów [95]. Warto przypomnieć wcześniejsze spostrzeżenie, że dziedziczenie koloru włosów, oczu oraz skóry musi być do pewnego stopnia niezależne, a więc uwarunkowane zmiennością w różnych *loci*. *TPCN2* składa się z dwudziestu pięciu eksonów i koduje produkt białkowy o długości 752 aminokwasów. Kolejnym wybiórczym markerem koloru włosów może być gen *KITLG* (MIM: 184745) [96]. Jak wspomniano wcześniej, produkt tego genu ma istotne znaczenie przy przedostawaniu się melanocytów do mieszka włosowego. U myszy ekspresja genu *KITLG* w poszczególnych grupach keratynocytów decyduje o tym, czy melanocyty ostatecznie pozostają w skórze, czy też trafiają do mieszka włosowego [4]. Gen ten również wykazywał korelację z kolorem włosów w populacji bada-

nej przez grupę Han i in. (2008), choć korelacja osiągnęła niską istotność statystyczną [42]. Ludzki gen *KITLG* posiada dwie izoformy: a (osiem eksonów, białko o długości 245 aminokwasów) oraz b (9 eksonów, białko o długości 273 aminokwasów). Kolejnym postulowanym ważnym determinantem koloru włosów, skóry oraz oczu u człowieka jest gen *IRF4* (MIM: 601900) [42, 96]. Grupa badawcza Sulem ustaliła, że pozycja polimorficzna leżąca pomiędzy genami *IRF4* oraz *EXOC2* na chromosomie 6 wykazuje związek z pigmentacją, ale żadnego z tych genów nie łączono uprzednio z fenotypem pigmentowym i dlatego trudno było określić, który z genów należy powiązać ze stwierdzonym efektem. Z badań przeprowadzonych przez Han i in. (2008) wynika, że bardziej prawdopodobne jest, że to gen *IRF4* jest związany ze zmiennością pigmentacji (korelacja z pigmentacją była znacznie silniejsza dla polimorfizmu położonego w obrębie genu *IRF4*) [42]. Jego produkt jest czynnikiem transkrypcyjnym zaangażowanym w proces regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na działanie interferonu i innych cytokin. Gen *IRF4* jest złożony z ośmiu eksonów i koduje białko o długości 451 aminokwasów. Bez wątpienia istotne znaczenie w determinacji fenotypu pigmentowego mogą mieć nie tylko geny o ustalonym statusie genów pigmentacyjnych, ale na przykład cały szereg genów dla elementów regulatorowych, np. czynników transkrypcyjnych. Jako ciekawostkę można podać przykład genu *Foxn1* u myszy. Jak napisano wcześniej, transfer melaniny wytwarzanej w melanocytach mieszków włosowych nie jest przypadkowy, lecz pigment trafia głównie do komórek warstwy korowej trzonu włosa. Weiner i in. (2007) sugerują, że to gen *Foxn1* kodujący czynnik transkrypcyjny jest odpowiedzialny za umożliwienie transferu melaniny do ściśle określonych keratynocytów [110].

Korelację z naturalną pigmentacją (kolorem oczu) wykazano również dla genów *MYO5A* (MIM: 160777), *TYRP1* (MIM: 115501) oraz *TYRP2*, który znany jest bardziej jako *DCT* (MIM: 191275) [32, 95]. Gen *MYO5A* jest odpowiedzialny za transport melanosomów [102]. Jest to duży gen składający się z trzydziestu ośmiu eksonów, kodujący białko o długości 1855 aminokwasów. Produkty genów *TYRP1* oraz *DCT* występują wyłącznie w eumelanosomach i zaangażowane są w szlak syntezy eumelaniny. *TYRP1* złożony jest z 7 eksonów i koduje białko o długości 537 aminokwasów. Jest on jednym z genów odpowiedzialnych za albinizm oczno-skrótny u człowieka. Gen *DCT* składa się z 8 eksonów i koduje białko o długości 519 aminokwasów. Oba geny łączy prawdopodobnie historia ewolucyjna, gdyż posiadają wspólny ekson z genem *TYR*. Przyjmuje się, że gen *DCT* wywodzi się z genu *TYRP1*, który powstał wcześniej na drodze duplikacji genu *TYR* [94].

Zmienność fenotypowa w pigmentacji może wynikać z addytywnego udziału wielu genów, nie można jednak

również wykluczyć, że istotną rolę odgrywają interakcje pomiędzy nimi. Bateson w 1909 roku zwrócił uwagę na istnienie efektów epistatycznych mogących kształtować zmienność fenotypową [6]. Pierwszy udokumentowany przypadek efektów epistatycznych kształtujących fenotyp pigmentowy opisał Akey i in. (2001). Niezależna analiza polimorfizmu w dwóch istotnych genach pigmentacyjnych, tj. *MC1R* oraz *OCA2*, nie wykazała ich związku z fenotypem pigmentowym w badanej populacji tybetańskiej. Jednak uwzględnienie modelu epistatycznego wykazało istotną rolę tych genów w pigmentacji skóry we wspomnianej populacji [2]. King i in. (2003) wykazali, że mutacje w genie *MC1R* modyfikują efekt alleli genu *OCA2* odpowiedzialnych za determinację albinizmu oczno-skrótnego. Pacjenci dotknięci albinizmem typu 2, którzy posiadali warianty genu *MC1R* związane z fenotypem RHC, mieli również rudej kolor włosów. Powyżej opisano postulowaną istotną rolę interakcji pomiędzy genami *OCA2* i *HERC2* w determinacji koloru tęczówki oka u człowieka [58]. Branicki i in. (2009) wykazali, że gen *HERC2* może także wykazywać działanie epistatyczne względem genu *MC1R*. Zgodnie z przedstawionym modelem, allel genu *HERC2* (rs12913832) związany z ciemniejszą pigmentacją może neutralizować efekt mutacji genu *MC1R* odpowiedzialnego za determinację jaśniejszego typu skóry. Efekt ten zaobserwowano w przypadku heterozygot posiadających jeden zmutowany wariant R genu *MC1R* [15].

Jak dotąd zbadano niewielką część genów mogących kształtować fenotyp pigmentowy człowieka. W badaniach asocjacyjnych istotne znaczenie ma powtarzanie pierwotnych wyników badań w innych próbach populacyjnych, więc koniecznych jest jeszcze sporo badań podstawowych tego typu. Co więcej, dla większości opisanych polimorfizmów nie przeprowadzono badań funkcjonalnych, które są w stanie potwierdzić rolę poszczególnych pozycji polimorficznych w determinacji cech fenotypowych oraz pozwolić na określenie mechanizmu ich działania. Wydaje się jednak, że rosnąca liczba danych umożliwi wkrótce stworzenie bardziej szczegółowego opisu mechanizmów prowadzących do naturalnego zróżnicowania fenotypu pigmentowego człowieka na świecie. Optymistycznie przedstawia się również wizja predykcji cech pigmentowych w aspekcie sądowym.

## 5. Badania nad epistazą

Bateson zauważył, że wariant jednego genu może uniemożliwiać ujawnienie się pełnego efektu fenotypowego wywoływanego przez inny gen. Zjawisko to nazywane jest epistazą lub interakcjami genetycznymi i definiowane za Batesonem jako maskowanie efektu fenotypowego genu przez warianty genetyczne innego genu [6]. Zgodnie z inną, bardziej statystyczną definicją,

epistaza to brak addytywności w modelu matematycznym opisującym związek pomiędzy wariantami genetycznymi a cechą o charakterze poligenicznym [20, 30]. Postuluje się, że interakcje genetyczne mogą mieć istotny udział w procesie determinacji cech złożonych u człowieka, podobnie jak interakcje na poziomie molekularnym stanowią istotny element m.in. regulacji ekspresji genów czy też transdukcji sygnału [18, 68]. Problem epistazy należy obecnie do zagadnień słabo poznanych, podobnie jak sama genetyka cech wielogenowych. Pojawily się dane, z których wynika, że efekty epistatyczne należy uwzględnić, prowadząc badania nad determinacją fenotypu pigmentowego [2, 15, 28]. Można wyróżnić dwie podstawowe grupy metod statystycznych, które umożliwiają prowadzenie badań nad epistazą [70, 103]. Pierwsza grupa obejmuje różne warianty regresji, np. najbardziej popularne regresję liniową oraz logistyczną. Zastosowanie jednej z tych metod uzależnione jest od typu posiadanych danych, a właściwie charakteru badanej cechy fenotypowej będącej zmienną wyjaśnianą (charakter ciągły sugeruje zastosowanie regresji liniowej, charakter dychotomiczny – regresji logistycznej). Zmienna o charakterze ciągłym, jaką jest kolor oczu, badana jest jednak często za pomocą regresji logistycznej poprzez zredukowanie danych do dwóch kategorii: np. oczy niebieskie – nieniebieskie. Niska liczebność danych oraz wysoka liczba stopni swobody może prowadzić do częstszego pojawiania się błędu pierwszego rodzaju, a więc uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich, przy zastosowaniu metod regresji. Druga grupa obejmuje metody redukcji wymiarowości. W grupie tej znajduje się coraz popularniejsza metoda wieloczynnikowej redukcji wymiarowości (ang. multifactor dimensionality reduction, MDR) [79]. Metoda ta pozwala na zredukowanie wielowymiarowego modelu poprzez sklasyfikowanie wszystkich genotypów do jednej z dwóch grup. W konsekwencji uzyskuje się jedną zmienną o dwóch wieloczynnikowych kategoriach („wysokiego ryzyka” oraz „niskiego ryzyka”) odnoszących się do posiadania danego fenotypu [41]. Metoda MDR jest nieparametryczna, a każdy utworzony jednowymiarowy model podlega ocenie za pomocą testów permutacyjnych oraz walidacji krzyżowej, przez co może ona być szczególnie efektywna w wykrywaniu interakcji genetycznych. Poza różnymi wariantami w obrębie tych dwóch grup metod proponowano również metodę z grupy metod rozpoznawania wzorca polegającą na zastosowaniu systemów uczących się, a więc praktycznym wdrożeniu idei sztucznej inteligencji [80]. Metoda ta na razie jednak nie jest powszechnie używana do analizy efektów epistatycznych.

## 6. Podsumowanie

Z przewidywanych 127 genów związanych z pigmentacją człowieka [9] zaledwie kilka (*MC1R*, *OCA2*, *SLC45A2*, *ASIP*) lepiej poznano pod względem polimorfizmu i jego korelacji z cechami fenotypowymi. Obecnie dla celów sądowych możliwa jest predykcja rudego koloru włosów [13, 38]; wkrótce należy również oczekiwać pojawienia się niekomercyjnych testów umożliwiających predykcję koloru oczu. Wiele nowych danych na temat potencjalnych genów (regionów genomu) dostarczyły badania typu GWAS, które jednak stanowią zaledwie pierwszy etap na drodze do identyfikacji polimorfizmów odpowiedzialnych za efekt fenotypowy. Dalsze szczegółowe badania, w tym analizy funkcjonalne, pozwolą na identyfikację konkretnych polimorfizmów odpowiedzialnych za determinację fenotypu (ang. causative variants). Prowadząc badania nad efektem genów na fenotyp pigmentowy, należy uwzględnić nie tylko możliwość addytywnej roli wielu genów, ale również efektów epistatycznych pomiędzy nimi. W rezultacie badania umożliwią poznanie mechanizmów genetycznych i molekularnych odpowiedzialnych za determinację cech pigmentacyjnych człowieka. Pozwolą również na prowadzenie wiarygodnej predykcji cech fenotypowych przy minimalnej liczbie analizowanych pozycji polimorficznych. W związku z dużą złożonością analiz predykcyjnych (dużą liczbą polimorfizmów, ich niejednakowym znaczeniem dla fenotypu oraz różnym charakterem interakcji pomiędzy nimi), do opracowania wyników przydatne będą odpowiednie narzędzia i programy statystyczne, na przykład zastosowanie koncepcji sieci bayesowskich.

### Podziękowania

Pracę dedykuję pamięci Aleksandra Głazka, wieloletniego dyrektora Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie. Bez zdecydowanego wsparcia z Jego strony, które otrzymywałem na każdym etapie moich podejmowanych działań badawczych, nie wyobrażam sobie, by mógł powstać niniejszy artykuł, jak również moje poprzednie prace poświęcone genetycznej predykcji fenotypu pigmentowego.