



POLYMORPHISM OF THE *SLC45A2* GENE AND PROSPECTS FOR ITS APPLICATION IN FORENSIC SCIENCE

Jolanta DRAUS-BARINI¹, Magdalena MARCIŃSKA¹, Urszula BRUDNIK², Wojciech BRANICKI¹

¹ *Institute of Forensic Research, Krakow, Poland*

² *Department of Dermatology, Collegium Medicum of Jagiellonian University, Krakow, Poland*

Abstract

The *SLC45A2* gene encoding 560-amino acid membrane associated transporter protein has been found to influence the melanosomes differentiation pathway and thus it is considered one of the most important pigmentation genes. It has been shown that two non-synonymous polymorphisms, rs26722 and rs16891982, and some SNPs located in the promoter region of *SLC45A2* are associated with physiological differences in human pigmentation. Here we present results of research conducted on one of these promoter region polymorphisms – rs6867641 (c.-1169G > A) in a population of individuals from Poland with pigmentation characteristics defined by dermatological survey. Results of this study show the prevalence of the ancestral allele c.-1169G present in this population sample and a weak association of the rs6867641 with eye colour but not with skin and hair colour. The problem of differences between the association pattern characteristic for *SLC45A2* and various population samples is discussed.

Key words

Forensic genetics; *SLC45A2*; Association study; Forensic phenotype prediction; Replication inconsistency.

Received 24 October 2008; accepted 12 January 2009

1. Introduction

The most striking pigmentation phenotype in humans is known as oculocutaneous albinism (OCA) and is characterised by deficiency or absence of melanin pigmentation. A few different types of albinism have been described in humans. Particular types are caused by mutations in single genes that include: *TYR*, *OCA2*, *TYRP1* and *SLC45A2* [19]. These and some other important pigmentation genes like *MC1R* and *ASIP* are now the subject of intensive studies investigating their role in physiological variation of human pigmentation. All these genes are thought to affect the complex process of pigment synthesis and distribution, particularly the number and size of melanosomes produced and the amount and type of melanin synthesised [21]. Melano-

some are subcellular compartments of melanocytes that synthesise and store the melanin pigment. Melanin is a biopolymer that occurs in two different forms: black-brown eumelanin and red-yellow pheomelanin. The type, quantity and distribution of melanin determine the colour of the irides, hair and skin. Melanin present in the skin is involved in UV-light protection limiting the risk of skin cancer and it is generally believed that the geographic distribution of human skin colour today reflects a history of adaptation to latitude-dependent levels of UVR [15]. Indeed, individuals tend to have lighter skin colour with an increasing distance from the equator. Dark pigmentation, according to present knowledge, is regarded as an ancestral phenotype. This fact has a great impact on contemporary understanding of evolution of human pigmenta-

tion and gene function. It has been hypothesised that light skin colour might have been preferred by positive selection in Northern Europe, possibly in relation to light shortage and vitamin D synthesis in skin. It is interesting to note that most eye colour and hair colour variation is found among individuals of European ancestry and it is assumed that these traits may also have been shaped by various evolutionary forces, including sexual selection. Similarly to mouse model species, the human pigmentation phenotype is considered to be determined by more than 120 genes [2]. Evidence of positive selection has been found for a few of them. One of them is the *SLC45A2* gene which is located on chromosome 5p13.3, has seven exons spanning a distance of 40 kb and encodes 560 amino acid membrane associated transporter protein (MATP). The analogue of this gene was discovered by Newton and co-workers in mice [18]. Studies conducted on the mouse *Slc45a2* locus showed involvement of this gene in the processing and intracellular trafficking of tyrosinase and some other melanosomal proteins [4]. Particular mutations in the human MATP gene lead to type 4 albinism, which has been initially described by Inagaki et al. for the Japanese population [14] and has also been revealed in German and Korean populations by Rundshagen et al. [22]. *SLC45A2* has also been implicated in natural variation of human pigmentation. Two non-synonymous polymorphisms, rs26722 and rs16891982, have been associated with human pigmentation in various populations. Interestingly, some differences in association patterns have been noted for various population samples [5, 7, 10]. Recently, three tightly linked SNPs from the promoter region of the *SLC45A2* gene have also been associated with pigmentation characteristics in one study [9]. The polymorphisms associated with pigmentation features may be of special use to forensic science, allowing phenotype prediction based on analysis of biological samples originating from unknown perpetrators. Thus, we further investigated the role of *SLC45A2* and analysed the two above mentioned non-synonymous polymorphisms, rs26722 and rs16891982. Both the SNPs were found to be associated with hair colour, but surprisingly not with skin type or eye colour [3].

Here we present results of examination conducted on one of the previously discovered pigmentation associated SNPs from the *SLC45A2* promoter region. The differences in association patterns discovered for *SLC45A2* are also summarised and the possible causes of this phenomenon discussed.

2. Materials and methods

2.1. DNA samples

Three hundred and eighty eight samples (buccal swabs) from unrelated men and women were collected by a single dermatology specialist, who categorised the study population by skin, hair and eye colour. Skin colour was recorded according to the Fitzpatrick scale combined with additional examination of non-exposed skin area [8]. Natural hair pigmentation was categorized as red/blond-red, blond, dark blond, auburn or black. Eye colour was classified as blue, green, hazel or brown. The overall classification is shown in Table I. The samples were collected with the consent of the Ethics Committee of the Jagiellonian University.

TABLE I. CLASSIFICATION OF SOUTH-POLISH POPULATION SAMPLE STUDIED BY PHENOTYPE

| | Characteristics | Cases (N = 388) | n [%] |
|-------------|-----------------------|--------------------|----------|
| Eye colour | Blue/grey | 216 | 55.7 |
| | Green | 46 | 11.9 |
| | Hazel | 81 | 20.9 |
| | Brown/black | 45 | 11.6 |
| Hair colour | Red/blond-red | 84 | 21.7 |
| | Blond | 63 | 16.2 |
| | Dark blond | 182 | 47 |
| | Auburn | 12 | 3.1 |
| | Black | 47 | 12.1 |
| Skin type | Light skin (I or II) | 172 | 44.3 |
| | Dark skin (III or IV) | 216 | 56.7 |
| Gender | Male | 151 | 38.9 |
| | Female | 237 | 61.1 |

2.2. Genotyping

DNA was extracted using the phenol-chloroform or silica based method according to procedures described elsewhere [3].

The DNA region encompassing c.-1169 A/G polymorphism (rs6867641) AACGATCACACACGGCT-TCTCTCTCA[C/T] ACACATTATTACACATGACC-ACACA was amplified in a multiplex reaction together with two other SNPs from the *HERC2* gene (data not present) using a Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen,

TABLE II. IMPORTANT POLYMORPHISMS AND THEIR ALLELE FREQUENCY FOR *SLC45A2* AS ASCERTAINED IN DIFFERENT STUDIES

| Population group | c.-1169 G/A allele frequency of <i>SLC45A2</i> promoter variant | | rs26722 | | rs16891982 | |
|-----------------------------|---|-------|---------|-------|------------|-------|
| | G | A | G | A | G | C |
| European origin Australian* | 0.646 | 0.354 | – | – | – | – |
| Asian* | 0.803 | 0.197 | 0.661 | 0.339 | 0.113 | 0.887 |
| African American* | 0.761 | 0.239 | 0.750 | 0.250 | 0.414 | 0.586 |
| Australian Aboriginal* | 0.543 | 0.457 | 0.971 | 0.029 | 0.275 | 0.725 |
| Spanish Basque* | 0.463 | 0.537 | – | – | – | – |
| Polish** | 0.634 | 0.366 | 0.985 | 0.015 | 0.023 | 0.977 |

* Graf et al. studies [9, 10]; **Branicki et al. [3] and this study; “–” no data available.

Hilden, Germany). The primers were as follows: forward: CACACACGTTATTACACAACGATC and reverse: GAGAAGCCATGAGTCCGATCATGT at a concentration of 0.125 M. DNA quantity was 1–10 ng per sample and the total reaction volume was 10 l. The temperature profile was as recommended by the manufacturer: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 32 cycles of denaturation at 94°C for 60 s, annealing at 61°C for 60 s, and extension at 72°C for 90 s and a final elongation step at 72°C for 10 min. Five microliters of the PCR products were treated with a mixture of ExoI and SAP enzymes (Fermentas, Vilnius, Lithuania) for purification.

A minisequencing reaction was performed using 2 l of the SNaPshot mix (Applied Biosystems, Foster City, USA), 1 l of extension primer with the following sequence: 5'-CACACGGCTTCTCTCTCA (0.2 M) and 1 l of purified PCR product. The reaction was carried out using a temperature profile as recommended by the manufacturer, i.e. 25 cycles: denaturation at 96°C for 10 s, annealing at 50°C for 5 s, and extension at 60°C for 30 s, in a total volume of 10 l. The purification was performed using SAP enzyme (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Capillary electrophoresis was done using ABI 3100 Avant genetic analyser and the SNP protocol.

2.3. Statistical analyses

Arlequin software 3.1 [6] was used for Hardy-Weinberg equilibrium evaluation and linkage disequilibrium testing. The SPSS 12.0 computer program was used for examination of significance of associations between the studied SNP and various pigmentation traits. Logistic regression was used to assess the Odds

Ratios (*OR*) and confidence intervals (*CI*) associated with each predictor value. *OR* is a measure of effect size defined as the ratio of the odds of an event occurring in one group to the odds of it occurring in another group.

3. Results and discussion

The *SLC45A2* gene is considered one of the most important pigmentation genes in humans. Graf et al. discovered that two non-synonymous SNPs are significantly associated with natural differences in skin, eye and hair colour in a population of European origin [9]. The investigation that we performed showed only partial replication of this finding (association with hair colour and not with skin and eye colour) and we explained this by a lack of power to detect because of very low frequency of minor alleles in the Polish population [3]. In a recent paper, Graf et al. reported association between another three tightly linked polymorphisms located in the promoter region of the *SLC45A2* gene and pigmentation variation [10]. We checked one variation (of these SNPs): rs6867641; c.-1169 A/G in our population sample consisting of 388 unrelated individuals with defined phenotype characteristics. Using logistic regression we investigated potential associations between its allelic variants and different eye, hair and skin colours. Details concerning the population study are given in Table I. The frequency distributions of the c.-1169 A and G alleles were found to be at the same level as for other European origin populations investigated by Graf et al. (Table II) [10]. The studied polymorphism was found to be in HW equilibrium ($p = 0.38015$).

TABLE III. PATTERNS OF ASSOCIATION REVEALED FOR DIFFERENT SLC45A2 POLYMORPHISMS IN VARIOUS POPULATIONS OF EUROPEAN ORIGIN

| rs26722 | rs16891982 | rs6867641 | |
|------------------------|------------------------|-------------|----------------------|
| – | – | Eye colour | This study |
| Hair colour | Hair colour | | Branicki et al. [3] |
| Skin, eye, hair colour | Skin, eye, hair colour | – | Graf et al. [9] |
| – | – | Skin colour | Graf et al. [10] |
| – | Skin, eye, hair colour | – | Fernandez et al. [7] |
| Hair colour | Skin colour | – | Cook et al. [5] |
| Non-significant | Skin, hair colour | – | Han et al. [11] |

“–” – No data.

Our data shows the overrepresentation of the rs6867641 G allele among individuals with brown eyes and this result achieved the level of significance in the performed statistical test ($p = 0.04$, $OR = 1.9$, $CI = 1.03–3.6$). However, the obtained p value is very weak and it lacks significance after Bonferroni correction for multiple testing. It is noteworthy that the G allele is the ancestral one (see data for rs6867641 at www.ncbi.nlm.nih.gov) and is overrepresented among individuals with brown eye colour. This result is consistent with our current knowledge on evolution of human pigmentation. Contrarily, Graf et al. [10] found an association of the A allele with olive skin colour ($p = 0.003$, $OR = 2.11$) in comparison with individuals having the c.-1169G and fair skin. There were no associations with eye and hair colour in this study. In a recent large association study, Han et al. concluded that of the *SLC45A2* SNPs described by Graf’s team, only one exonic SNP, namely rs16891982, was significantly associated with pigmentation [11]. Their conclusion was based on performed multivariate analysis in which they included one of the promoter polymorphisms described by Graf et al. [10] and two exonic *SLC45A2* SNPs: rs26722 and rs16891982 [9]. Thus, the association of rs 6867641 (and the other promoter polymorphisms discovered by Graf et al. [10]), if real, should be considered as very weak. We also checked that in the studied population sample no *LD* exist between the promoter rs6867641 SNP and the two above mentioned exonic polymorphisms, rs26722 and rs16891982. The same observation was reported by Graf et al. [10]. These two non-synonymous polymorphisms referring to amino acid alterations Glu272Lys and Leu374Phe were shown by Graf et al. [9] to be significantly associated with dark hair, skin and eye colour in various populations of European ori-

gin. Moreover, Soejima et al. [23] provided evidence for positive selection that favours the 374Phe variant in Europe, and in further studies they suggested the usefulness of this polymorphism as an ancestry-informative marker [23, 24]. In our study, both variants: 272Lys and Leu374 were linked to black hair colour (272Lys $p = 0.002$; Leu374 $p < 0.001$) and not to skin type or eye colour [3]. Interestingly, Cook et al. [5] have also found a different pattern of association when studying the same two exonic *SLC45A2* polymorphisms. Their research indicated that the polymorphism Glu272Lys (rs26722) was connected solely with hair colour ($p = 0.017$), whilst Leu374Phe, rs16891982 was strongly associated with skin colour ($p = 2.2 \cdot 10^{-6}$), but not with eye and hair colour [5]. A summary of differences in association patterns noted for *SLC45A2* is given in Table III.

The observed differences raise questions – firstly about their cause and secondly about the real effect of *SLC45A2* on pigmentation in humans. Problems linked with replication of initial genetic associations have been studied more thoroughly by Hirschhorn et al. [13], who investigated 603 reports on genotype-phenotype associations relating to a total number of 168 genes. They concluded that consistent replication of the initial associations was rather rare. That authors proposed four possible reasons for the observed discrepancies in association studies. The first possible cause is a hidden population stratification. The allele which occurs more frequently in a particular phenotypic group may be disproportionately frequent in the tested sample and in this way influences the results. This issue was thoroughly discussed by Balding [1], who considered population stratification a very important cause of spurious associations. Undoubtedly, this problem cannot be ruled out in the case of various

studies conducted on *SLC45A2*. However, a population stratification seems to be rather unlikely in the present study as previous analyses of our population samples have shown that the population is rather homogenous [25]. Differences in *LD* structure characteristic for various populations may also lead to discrepancies in associations. The studied SNP may not be directly responsible for phenotype determination but is in linkage disequilibrium with the causal variant. As different recombination histories may characterise various populations, this may seriously affect results of population studies. This issue is discussed in detail by Pritchard and Przeworski [20]. The position rs16891982 has been suggested to be the causal variant or closely linked with the causal variant [e.g. 11], thus the differences in *LD* structure are rather unlikely to be a cause of observed inconsistencies in associations. Non-replication may also be related to a weak genetic effect associated with a particular SNP. Especially if studies are small in size, they may have not enough power to detect such weak effects. This potential cause seems to be very probable, as the studies involving rs16891982 have been conducted mostly on small populations [3, 5, 7, 9, 10]. Finally, turning to gene-gene and gene-environment interactions – these may be different in various populations and are related to the genetic or environmental background characteristic for particular populations. The underestimated role of gene-gene interactions in studies concerning complex traits has been thoroughly discussed by Moore [16]. This potential cause of the observed discrepancies should not be neglected and is worth investigating more closely. Problems with adequate replication of initial association findings are also discussed by other authors. Healy lists the above mentioned causes: inadequate statistical power to detect small and moderate effects and population stratification, as well as phenotype heterogeneity, publication bias and multiple comparison testing as possible causes of non-replication [12]. Neale and Sham [17] have proposed a gene based approach to association analysis as a solution to reduce the typical drawbacks of the SNP or haplotype approach, such as incorrect findings due to genetic differences between populations. Wray et al. [26] have suggested that the possibility of accurate prediction of genetic risk may be increased by combining results obtained from different studies or significantly increasing the sample sizes.

Genetic prediction of physical traits is undoubtedly a very promising idea for forensic science. So far, only red hair colour phenotype can be predicted with reasonable certainty by genetic assays. The proposed methods are based on genotyping of specific mutations

in the *MC1R* gene. The next genes which should soon be included in predictive analyses are two neighbouring genes, *HERC2* and *OCA2*, which are responsible for most of the variation in human eye colour. Further analyses, including functional studies and testing potential genetic interactions are necessary to unambiguously establish the role of polymorphisms within *SLC45A2* in human pigmentation.

Acknowledgements

The study was supported by the Institute of Forensic Research in Krakow, grant number I/G/2008.

References

1. Balding D. J., A tutorial on statistical methods for population association studies, *Nature Reviews* 2006, 7, 781–791.
2. Bennett D. C., Lamoreux M. L., The color loci of mice – a genetic century, *Pigment Cell Research* 2003, 16, 333–334.
3. 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, DOI 10.1007/s10038-008-0338-3.
4. 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.
5. 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* 2008, DOI:10.1038/jid.2008.211.
6. Excoffier L., Laval G., Schneider S., Arlequin ver 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis, *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005, 1, 47–50.
7. Fernandez L. P., Milne R. L., Pita G. [et al.], *SLC45A2*: a novel malignant melanoma-associated gene, *Human Mutation* 2008, 29, 1161–1167.
8. Fitzpatrick T. B., The validity and practicability of sun-reactive skin types I through VI, *Archives of Dermatology* 1988, 124, 869–871.
9. 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.
10. 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.

11. 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, 16, e1000074.
12. Healy D. G., Case-control studies in the genomic era: a clinician's guide, *The Lancet Neurology* 2006, 5, 701–707.
13. Hirschhorn J. N., Lohmueller K., Byrne E. [et al.], A comprehensive review of genetic association studies, *Genetics in Medicine* 2002, 4, 45–61.
14. 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.
15. Jablonski N. G., Chaplin G., The evolution of human skin coloration, *Journal of Human Evolution* 2000, 39, 57–106.
16. Moore J. H., The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases, *Human Heredity* 2003, 56, 73–82.
17. Neale B. M., Sham P. C., The future of association studies: gene-based analysis and replication, *American Journal of Human Genetics* 2004, 75, 353–362.
18. Newton J. M., Cohen-Barak O., Hagiwara N. [et al.], Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, *OCA4*, *American Journal of Human Genetics* 2001, 69, 981–988.
19. Oetting W. S., King R. A., Molecular basis of albinism: mutations and polymorphisms of pigmentation genes associated with albinism, *Human Mutation* 1999, 13, 99–115.
20. Pritchard J. K., Przeworski M., Linkage disequilibrium in humans: models and data, *American Journal of Human Genetics* 2001, 69, 1–14.
21. Rees J. L., Genetics of hair and skin color, *Annuals Review of Genetics* 2003, 37, 67–90.
22. Rundshagen U., Zuhlke C., Opitz S. [et al.], Mutations in the *MATP* gene in five German patients affected by oculocutaneous albinism type 4, *Human Mutation* 2004, 23, 106–110.
23. Soejima M., Koda Y., Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes *SLC24A5* and *SLC45A2*, *International Journal of Legal Medicine* 2007, 121, 36–39.
24. Soejima M., Tachida H., Ishida T. [et al.], Evidence for recent positive selection at the human *AIM1* locus in European population, *Molecular Biology and Evolution* 2006, 23, 179–188.
25. Wolańska-Nowak P., Application of subpopulation theory to evaluation of DNA evidence, *Forensic Science International* 2000, 113, 63–69.
26. Wray N. R., Goddard M. E., Visscher P. M., Prediction of individual genetic risk of complex disease, *Current Opinion in Genetics and Development* 2008, 18, 257–263.

Corresponding author

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

POLIMORFIZM GENU *SLC45A2* I PERSPEKTYWA ZASTOSOWANIA JEGO ANALIZY W BADANIACH SĄDOWYCH

1. Wstęp

Najbardziej skrajny fenotyp pigmentowy człowieka charakteryzuje się znacznym lub całkowitym brakiem pigmentu (melaniny) i jest określany mianem albinizmu oczno-skórnego (OCA). Znanych jest kilka różnych form albinizmu u człowieka. Każda z nich jest wywołana mutacjami w jednym z czterech genów pigmentacyjnych, tj. *TYR*, *OCA2*, *TYRP1* lub *SLC45A2* [19]. Geny te są obecnie, wraz z innymi znanymi genami pigmentacyjnymi (np. *MC1R* i *ASIP*), przedmiotem szczegółowych badań zmierzających do określenia ich znaczenia dla fizjologicznej zmienności pigmentacji człowieka. Przyjmuje się, że geny pigmentacyjne są odpowiedzialne za złożony proces syntezy i dystrybucji pigmentu, a w szczególności wpływają na liczbę i rozmiary wytwarzanych melanosomów oraz ilość i rodzaj syntetyzowanej melaniny [21].

Melanosomy są strukturami komórkowymi melanosytów, w których syntetyzowany, a następnie przechowywany, jest pigment. Melanina jest biopolimerem występującym w dwóch różnych formach: jako brązowo-czarna eumelanina oraz czerwono-żółta feomelanina. Rodzaj, ilość oraz rozmieszczenie melaniny determinuje kolor tęczówki oka, włosów oraz skóry. Obecna w skórze melanina pełni funkcję ochronną przed promieniowaniem UV, zmniejszając tym samym ryzyko rozwoju nowotworów skóry. Powszechnie przyjmuje się również, że geograficzne rozmieszczenie osób o podobnej barwie skóry stanowi odzwierciedlenie historii adaptacji do zależnego od szerokości geograficznej poziomu promieniowania UV [15]. Rzeczywiście, kolor skóry jest u ludzi coraz jaśniejszy wraz ze wzrostem odległości od równika. Ciemna pigmentacja, zgodnie z obecnym stanem wiedzy, jest uważana za ancestralną. Ma to istotne znaczenie na współczesne poglądy dotyczące ewolucji pigmentacji i funkcji genów pigmentacyjnych u człowieka. Istnieje hipoteza, zgodnie z którą jasna skóra była na terenie Europy północnej faworyzowana przez dobór naturalny, prawdopodobnie w związku z niedoborem światła i syntezą witaminy D w skórze. Warto również zauważyć, że przeważająca część zróżnicowania koloru oczu oraz włosów ma miejsce w populacjach o pochodzeniu europejskim. Przyjmuje się, że cechy te mogły być kształtowane przez różnego typu mechanizmy ewolucyjne, w tym być może dobór płciowy. Poprzez analogię do myszy uważa się, że pigmentacja u człowieka może zależeć od ponad 120 genów [2]. W przypadku kilku z nich udowodniono działanie doboru pozytywnego. Jednym z tego typu genów jest gen *SLC45A2*, który jest położony na chromosomie 5p13.3. Posiada on siedem

eksonów rozpostartych na dystansie 40 tysięcy par zasad i kodujący białko transportujące związane z błoną melanosomu (ang. membrane associated transporter protein, MATP) o długości 560 aminokwasów. Analog tego genu został odkryty przez Newtona i in. u myszy [18]. Badania przeprowadzone nad mysim *locus SLC45A2* wykazały, że gen jest zaangażowany w przetwarzanie i wewnątrzkomórkowy transport tyrozynazy i innych białek zawartych w melanosomie [4]. Niektóre mutacje w ludzkim genie *SLC45A2* prowadzą do albinizmu typu 4 opisanego przez Inagaki i in. u Japończyków [14], a następnie ujawnionego również w populacjach: niemieckiej i koreańskiej przez Rundshagen i in. [22]. Wykazano także, że gen *SLC45A2* jest związany z naturalną zmiennością pigmentacji u człowieka. Dwa niesynonimiczne polimorfizmy rs26722 i rs16891982 powiązано z pigmentacją człowieka w różnych populacjach. Co ciekawe, w przypadku poszczególnych populacji stwierdzono nieco odmienny wzór korelacji z pigmentacją [5, 7, 10]. Ostatnio pojawiło się również jedno doniesienie na temat korelacji trzech ściśle sprzężonych pozycji typu SNP w regionie promotorowym genu *SLC45A2* z cechami pigmentacyjnymi [9]. Polimorfizmy wykazujące związki z fenotypem pigmentowym mogą potencjalnie być użyteczne dla nauk sądowych, umożliwiając predykcję fenotypu w oparciu o analizę próbek biologicznych pochodzących od nieustalonych sprawców przestępstw. Mając na celu dalszą analizę znaczenia genu *SLC45A2* dla predykcji fenotypu pigmentowego, poddano analizie dwa wspomniane powyżej niesynonimiczne polimorfizmy rs26722 i rs16891982. Obie pozycje SNP wykazały korelację z kolorem włosów, lecz nieoczekiwanie nie były skorelowane z typem skóry oraz kolorem oczu [3].

Niniejsza praca przedstawia wyniki analizy jednego z opisanych wcześniej polimorfizmów typu SNP w regionie promotorowym genu *SLC45A2* skorelowanego z naturalną pigmentacją. W pracy opisano również różnice we wzorze korelacji odkrytych dla genu *SLC45A2* i poddano dyskusji możliwe przyczyny występowania tego zjawiska.

2. Materiały i metody

2.1. Próbkі DNA

Badaniom poddano 388 próbek pochodzących od niespokrewnionych kobiet i mężczyzn. Materiał badawczy (wymazy z jamy ustnej) został zebrany przez specjalistę z zakresu dermatologii, który dla każdej osoby uwzględ-

nionej w badaniach zdefiniował fenotyp pigmentowy (kolor skóry, włosów oraz oczu). Kolor skóry określono przy zastosowaniu skali zaproponowanej przez Fitzpatricka [8] i dodatkową analizę powierzchni nienarażonej na działanie promieni słonecznych. Naturalny kolor włosów sklasyfikowano jako rudy, rudy blond, blond, ciemny blond (szatyn), kasztanowy, czarny. Kolor oczu sklasyfikowano jako niebieski, zielony, piwny lub brązowy. Kompletną charakterystykę fenotypu pigmentowego przedstawiono w tabeli I. Próbkę zebrano za zgodą Komisji Bioetyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.

2.2. Genotypowanie

DNA izolowano z wymazów z jamy ustnej przy zastosowaniu metody fenolowo-chloroformowej lub krzemionkowej zgodnie z uprzednio opisanymi procedurami [3]. Fragment DNA obejmujący polimorfizm c.-1169 A/G (rs6867641) AACGATCACACACGGCTTCTCTCTCA [C/T] ACACATTATTACACATGACCACACA amplifikowano w reakcji typu multipleks łącznie z dwoma innymi polimorfizmami typu SNP w genie *HERC2* (dane nieprezentowane) przy zastosowaniu zestawu Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Stosowano startery reakcji PCR o następujących sekwencjach: F: CACACACGTTATTACACAACGATC i R: GAGAAGCCATGAGTCCGATCATGT i stężeniu 0,125 M. Stężenie matrycowego DNA wynosiło od 1–10 ng w całkowitej objętości mieszaniny reakcyjnej 10 μ l. Stosowano profil temperaturowy rekomendowany przez producenta zestawu: denaturacja wstępna w temperaturze 95°C przez 15 min, a następnie 32 cykle: denaturacja w temperaturze 94°C przez 60 s, przyłączanie starterów w temperaturze 61°C przez 60 s, wydłużanie produktów w temperaturze 72°C przez 90 s, wydłużanie końcowe w temperaturze 72°C przez 10 min. Pięć mikrolitrów produktu PCR oczyszczano za pomocą mieszaniny enzymów ExoI i SAP (Fermentas, Vilnius, Litwa).

Reakcję minisekwencjonowania prowadzono z zastosowaniem 2 μ l mieszaniny SNaPshot (Applied Biosystems, Foster City, Stany Zjednoczone), 1 μ l startera o następującej sekwencji 5'-CACACGGCTTCTCTCTCA (0,2 M) oraz 1 μ l oczyszczonego produktu PCR. Zastosowano profil temperaturowy rekomendowany przez producenta zestawu, tj. 25 cykli: denaturacja w temperaturze 96°C przez 10 s, przyłączanie starterów w temperaturze 50°C przez 5 s i wydłużanie w temperaturze 60°C przez 30 s w całkowitej objętości 10 μ l. Oczyszczanie produktów reakcji minisekwencjonowania przeprowadzono przy zastosowaniu enzymu SAP (Fermentas, Vilnius, Litwa). Rozdział elektroforetyczny (elektroforeza kapilarna) prowadzono na aparacie ABI 3100 Avant z zastosowaniem protokołu do analizy SNP.

2.3. Analizy statystyczne

Analizy równowagi Hardy'ego-Weinberga oraz nierównowagi sprzężeń (ang. linkage disequilibrium, *LD*) prowadzono przy pomocy programu Arlequin, wersja 3.1 [6]. Program SPSS, wersja 12.0, wykorzystano do analizy korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami typu SNP a różnymi cechami pigmentacyjnymi. Regresję logistyczną zastosowano do oszacowania wartości ilorazu szans (ang. odds ratio, *OR*) i przedziału ufności (*CI*) dla poszczególnych wartości zmiennej wyjaśniającej. *OR* pozwala na określenie rozmiarów efektu i jest definiowana jako stosunek szansy zajścia zdarzenia w jednej grupie do szansy zajścia zdarzenia w drugiej grupie.

3. Wyniki i dyskusja

Gen *SLC45A2* jest uważany za jeden z najbardziej istotnych genów pigmentacyjnych u człowieka. Graf i in. odkryli, że dwa niesynonimiczne polimorfizmy SNP w tym genie są istotnie skorelowane z naturalną zmiennością w kolorze skóry, oczu oraz włosów w populacji ludzi o pochodzeniu europejskim [9]. Przeprowadzone przez autorów niniejszej pracy badania wykazały jedynie częściową replikację tych wyników (korelacja z kolorem włosów i brak korelacji z kolorem skóry oraz oczu), co wyjaśniono przez niską moc statystyczną testu (brakiem zdolności testu statystycznego do wykrycia różnicy pomiędzy porównywanymi grupami) spowodowaną bardzo niską częstością rzadszych alleli w badanej populacji z Polski [3]. W niedawno opublikowanej pracy Graf i in. opisali korelację pomiędzy trzema innymi polimorfizmami położonymi w regionie promotora genu *SLC45A2* a zmiennością pigmentacji [10]. Jeden z tych polimorfizmów (rs6867641; c.-1169 A/G) zbadano w przebadanej przez autorów niniejszej pracy próbie populacyjnej złożonej z 388 niespokrewnionych osób o zdefiniowanych cechach fenotypowych. Stosując regresję logistyczną, analizie poddano potencjalne korelacje pomiędzy allelami polimorfizmu rs6867641 a kolorem oczu, włosów oraz skóry. Szczegóły dotyczące badanej populacji przedstawiono w tabeli I. Stwierdzony rozkład częstości alleli c.-1169 A oraz G nie odbiegał od wartości przedstawionych przez Graf i in. dla populacji o pochodzeniu europejskim (tabela II) [10]. Wykazano również, że badany polimorfizm był w stanie równowagi *HW* ($p = 0,38015$).

Przeprowadzone badania wykazały nadmiar allelu rs6867641 G wśród osób posiadających brązowy kolor oczu, a wynik ten osiągnął istotność w przeprowadzonym teście statystycznym ($p = 0,04$, $OR = 1,9$, $CI = 1,03-3,6$). Uzyskana wartość p wskazuje jednak na bardzo słabą zależność, a stwierdzona korelacja traci istotność po wprowadzeniu poprawki Bonferroniego dla testów wie-

lokrotnych. Warto odnotować, że allel G jest allelem ancestralnym (zob. dane dla rs6867641 w serwisie www.ncbi.nlm.nih.gov) i występuje w nadmiarze u osób o brązowym kolorze oczu. Pozostaje to w zgodzie z obecną wiedzą na temat ewolucji pigmentacji u człowieka. Przeciwnie, Graf i in. [10] stwierdzili korelację pomiędzy allelem A a ciemniejszym kolorem skóry ($p = 0,003$, $OR = 2,11$) w porównaniu z osobami posiadających wariant c.-1169G i jasny kolor skóry; we wspomnianej powyżej pracy nie stwierdzono również zależności pomiędzy kolorem oczu oraz włosów. W opublikowanej niedawno pracy prezentującej wyniki szerokich badań asocjacyjnych Han i in. stwierdzili, że ze wszystkich polimorfizmów opisanych w genie *SLC45A2* przez zespół Graf, tylko jedna pozycja typu SNP, tj. rs16891982, wykazuje istotną korelację z pigmentacją [11]. Wnioski oparli na przeprowadzonej analizie wieloczynnikowej, w której uwzględnili jeden z opisanych przez Graf i in. polimorfizmów w regionie promotorowym [10] oraz dwa polimorfizmy w eksonach genu *SLC45A2*, tj. rs26722 i rs16891982 [9]. Wynika z tego, że korelacja w przypadku pozycji rs6867641 (i pozostałych dwóch polimorfizmów z regionu promotorowego opisanych przez zespół Graf), jeśli rzeczywiście istnieje, to jest bardzo słaba. Autorzy tej pracy sprawdzili również, że w badanej populacji nie ma sprzężenia genetycznego pomiędzy polimorfizmem promotora rs6867641 a dwoma wspomnianymi wcześniej polimorfizmami w eksonach rs26722 oraz rs16891982. Taki sam rezultat zaobserwowali także Graf i in. [10]. Te dwa niesynonimiczne polimorfizmy odnoszące się do zmian Glu272Lys i Leu374Phe są zgodnie z wynikami badań przeprowadzonych przez Graf i in. [9] i istotnie skorelowane z ciemniejszą pigmentacją włosów, skóry oraz oczu w różnych populacjach o pochodzeniu europejskim. Co więcej, Soejima i in. [23] wykazali, że zmiana 374Phe była faworyzowana przez dobór naturalny na terenie Europy, a w dalszych badaniach zasugerowali oni również użyteczność tego polimorfizmu w charakterze markera pochodzenia biogeograficznego [23, 24]. W opisanych tu badaniach obydwa warianty, tj. 272Lys i Leu374, wykazywały korelację z czarnym kolorem włosów (272Lys $p = 0,002$; Leu374 $p < 0,001$), a nie wykazywały korelacji z typem skóry oraz kolorem oczu [3]. Co ciekawe, Cook i in. [5] również stwierdzili inny wzór korelacji, analizując te same dwa polimorfizmy w eksonach *locus SLC45A2*. Ich badania ujawniły, że polimorfizm Glu272Lys (rs26722) jest związany wyłącznie z kolorem włosów ($p = 0,017$), a polimorfizm Leu374Phe (rs16891982) wykazywał silną korelację z kolorem skóry ($p = 2,2 \cdot 10^{-6}$), natomiast nie wykazywał korelacji z kolorem oczu oraz włosów [5]. W tabeli III zebrano różnice wzorów korelacji stwierdzone dla genu *SLC45A2*.

Zaobserwowane różnice powodują pytania, po pierwsze, o samą ich przyczynę, a po drugie o rzeczywiste zna-

czenie genu *SLC45A2* dla pigmentacji człowieka. Problemy związane z replikacją pierwotnie wykazanych korelacji genetycznych były przedmiotem szczegółowej analizy przeprowadzonej przez Hirschhorna i in. [13], którzy przeanalizowali 603 doniesienia na temat korelacji genotyp – fenotyp odnoszące się do łącznej liczby 168 genów. W rezultacie stwierdzili, że pozytywna replikacja pierwotnie postulowanych korelacji nie była zbyt częsta. Zaproponowali oni cztery możliwe przyczyny obserwowanych rozbieżności wyników z badań asocjacyjnych. Pierwszą możliwą przyczyną jest ukryta stratyfikacja populacji. Allel, który częściej występuje w grupie o określonym fenotypie, może być nieproporcjonalnie częsty w badanej próbie populacyjnej, a przez to wpływać na uzyskiwane wyniki analiz. Zagadnienie to szczegółowo omówił Balding [1], który uważa stratyfikację populacji za bardzo istotną przyczynę fałszywych korelacji. Bez wątpienia, problem ten może dotyczyć różnych badań nad genem *SLC45A2*. Jednak wpływ stratyfikacji populacji na uzyskane przez autorów tej pracy wyniki badań wydaje się raczej mało prawdopodobny, gdyż wcześniejsze analizy opisanej tu populacji wykazały jej homogenność [25]. Różnice w strukturze *LD* charakterystycznego dla poszczególnych populacji również mogą prowadzić do rozbieżności wyników badań asocjacyjnych. Badana pozycja SNP niekoniecznie musi bezpośrednio być odpowiedzialna za efekt fenotypowy, lecz jest sprzężona genetycznie z wariantem wykazującym efekt funkcjonalny. W związku z tym, że w różnych populacjach możliwa jest różna historia rekombinacji genetycznych, może to poważnie wpłynąć na wyniki badań populacyjnych. Zagadnienie to szczegółowo omówili Pritchard i Przeworski [20]. Sugerowano, że polimorfizm rs16891982 może bezpośrednio odpowiadać za efekt funkcjonalny lub być ściśle sprzężonym z pozycją posiadającą znaczenie funkcjonalne [np. 11], a więc różnice w strukturze *LD* stanowią raczej mało prawdopodobną przyczynę obserwowanych rozbieżności w wynikach badań asocjacyjnych. Brak pozytywnej replikacji może również wynikać z niewielkiego efektu genetycznego związanego z konkretnym polimorfizmem. Zwłaszcza w sytuacji, gdy badane próby populacyjne mają niską liczebność, niewielkie efekty związane z polimorfizmem mogą być trudne do uchwycenia za pomocą testów statystycznych z powodu ich niskiej mocy. Taka przyczyna wydaje się bardzo prawdopodobna, gdyż badania nad polimorfizmem genu rs16891982 przeprowadzono głównie na niewielkich próbach populacyjnych [3, 5, 7, 9, 10]. Należy wreszcie zwrócić uwagę na interakcje typu gen – gen oraz gen – środowisko, które mogą wykazywać różnice w przypadku różnych populacji i są związane z ich charakterystyką genetyczną lub środowiskową. Niedoceniane znaczenie interakcji genetycznych w badaniach nad cechami złożonymi omówił szczegółowo Moore [16]. Nie należy zaniedbywać tej poten-

cialnej przyczyny obserwowanych rozbieżności, a wspomniane zagadnienie warto zbadać dokładniej. Problemy z właściwą replikacją pierwotnych wyników badań asocjacyjnych diskutowane są również przez innych autorów. Healy wylicza wspomniane powyżej przyczyny: niewystarczająca moc statystyczna do wykrycia słabych i średnich efektów oraz stratyfikacja populacji, dodając również heterogenność fenotypu, tendencyjność publikacji oraz prowadzenie wielokrotnych testów porównawczych jako możliwe przyczyny braku replikacji [12]. Neale i Sham [17] zaproponowali metodę analizy genów do badań asocjacyjnych (ang. gen based approach) jako alternatywę pozwalającą na ograniczenie typowych problemów wynikających z prowadzenia badań na poziomie SNP lub haplotypów wynikających np. z nieprawidłowych wniosków w związku z różnicami genetycznymi pomiędzy populacjami. Wray i in. [26] zasugerowali, że możliwości prawidłowej predykcji ryzyka genetycznego można podnieść poprzez łączenie wyników uzyskanych z różnych badań lub poprzez znaczące podniesienie liczby analizowanych próbek.

Genetyczna predykcja cech fizycznych bez wątpienia jest niezwykle obiecującą ideą z punktu widzenia nauk sądowych. Jak dotąd, satysfakcjonujące prawdopodobieństwa można uzyskać wyłącznie prowadząc predyktywną analizę fenotypu charakteryzującego się rudym kolorem włosów. Zaproponowane metody polegają na analizie określonych mutacji w genie *MC1R*. Kolejne geny, których analiza będzie już wkrótce użyteczna dla celów predyktywnych, to dwa sąsiadujące geny *HERC2* i *OCA2*, które są odpowiedzialne za większą część zmienności obserwowanej w kolorze oczu człowieka. Dalsze analizy, uwzględniające także badania funkcjonalne oraz testowanie potencjalnych interakcji genetycznych, konieczne są w celu jednoznacznego określenia roli polimorfizmów w genie *SLC45A2* w determinacji pigmentacji u człowieka.

Podziękowania

Badania były finansowane ze środków Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie, numer projektu I/G/2008.