



THE SEARCH FOR GENETIC HEIGHT MARKERS FOR FORENSIC PURPOSES

Magdalena MARCIŃSKA, Wojciech BRANICKI

Institute of Forensic Research, Krakow, Poland

Abstract

Much effort in the field of forensic genetics in the future will undoubtedly be devoted to predicting physical characteristics. Significant progress towards forensic pigmentation prediction has been made recently and thus it is also interesting to enquire about the prospects for height prediction. Height is one of the most visible traits observed by witnesses, being a complex quantitative trait with strong heritability ranging according to various studies from 70 to 90%. Scientists have already searched for genes that account for normal variation of height in human populations. They have found several candidate genes, such as *ESR*, *CYP-19* and *VDR*, thanks to observed mutations that cause rare pathological stature syndromes. It has been argued that the most promising approach to detecting common alleles with only a modest impact on the phenotype is large genome-wide association studies. Indeed, this powerful method has led to identification of many genes significantly associated with human adult height, including *HMG2*, *GDF5-UQCC*, *ZBTB38* and *HHIP*. In addition, these findings have been confirmed in several independent studies. It has been demonstrated that the discovered variation explains only a small fraction of the overall variation in height. Research results suggest that there are great number of additive genetic variants with small effect size that influence height in the general population. Furthermore, it seems that association studies for height should take into account differences in genetic variation not only within a population, but also between populations. We should be aware of the fact that detecting non-additive mechanisms, such as interactions between genes (epistasis), can be important for understanding biological regulation of human height. Finally, recent progress in studies on the role of epigenetics in complex traits suggests the necessity for not underestimating this factor in the biology of human height.

Key words

Forensic genetics; Adult height; Genome-wide association studies; Epistasis; Epigenetics.

Received 22 October 2008; accepted 5 November 2008

1. Introduction

At present, a standard method employed in forensic genetics is the analysis of polymorphic noncoding DNA sequences, including nuclear DNA microsatellites (STR) and hypervariable mitochondrial DNA regions. Microsatellites are short, repeated sequences of nuclear DNA consisting of 2–6 nucleotides. They are characterised by a high variability resulting from a varying number of repeats of the characteristic motif, which makes these markers an excellent tool for indi-

vidual identification. High values of discrimination power obtained when analysing as few as 10–15 STR-type markers, as well as the relative ease of analysing simple DNA mixtures are additional factors in favour of employing the aforementioned markers in investigations leading to identification [1]. In routine analyses of trace biological materials, the most commonly employed kit is the SGM Plus system that includes ten STR loci and additionally amelogenin as the gender marker. On the other hand, in identification of human remains or in paternity cases it is necessary to extend

the panel of polymorphic markers, which is made possible by employing additional kits. Investigations of highly degraded DNA are increasingly commonly performed using microsatellite sequences with short amplicons, so-called miniSTR. When investigating male DNA (e.g. in rape cases), satisfactory results are obtained by analysing polymorphic markers of the Y chromosome, which are inherited through the paternal lineage. They are also employed in paternity cases when the child is male, as well as in identifying human remains, when the investigators have at their disposal comparative materials originating from the male lineage. Investigations of the Y chromosome have proven to be a helpful genetic marker in determining ethnicity. An additional identification marker is mitochondrial DNA inherited through the maternal line. Analysing this marker proves to be particularly valuable in investigations of hair shafts and extremely degraded materials, mainly human remains [1].

It seems that the future of forensic genetics is associated with analysis of informative SNP-type polymorphisms, which allow characterisation of a human phenotype on the basis of such properties as pigmentation, height or body mass. Predicting the physical appearance of a perpetrator of a crime through DNA sequence analysis in biological traces left at the crime scene would decidedly facilitate the challenges facing the prosecution. Oftentimes, especially in the case of extreme phenotypes, their prediction would allow investigators to narrow the investigation down to a lower number of suspects and thus to identify the perpetrator more quickly. Genetic prediction of phenotype properties might also be useful as a supplement to anthropological examinations of human remains. To date, forensic applications have been found for human pigmentation studies. These studies have yielded the first positive effects in the form of forensic tests serving to predict red hair colour [2, 8]. Recent progress in investigations into eye colour may also possibly soon lead to practical application of this knowledge on a larger scale [6, 22]. A private company has already introduced the first test allowing prediction of the colour of the iris (www.dnprint.com).

Undoubtedly, height is one of the most distinctive physical properties, easily observable by witnesses of a crime. For a long time now, height has been accepted to be a multigenic trait, additionally affected by environmental factors and interactions between these variables. Twin, family and adoption studies suggest that 70–90% of trait variability may be explained by genetic effects [10, 16, 26]. Over the generations, better living conditions and a diet richer in nutrients have resulted in a gradual increase in the mean height of hu-

mans. Nevertheless, genetic factors continue to be the overriding determinant of height, which has been best illustrated by studies on malnourished children in Gambia that demonstrated a considerable effect of genes on natural regulation of height even when access to food was limited [13]. It is assumed that there may be a great number of genes that control height in humans, and each of these genes only to a small degree affects phenotypic variability in human height in the general population.

2. Studies on genetic determination of height

Population association studies are considered to be the most effective tool for detecting genetic variants which exert moderate effects on phenotypic traits. In the search for “height genes”, investigators initially focused mainly on so-called candidate genes that play a substantial role in the process of bone growth and development. Human height is controlled by two basic hormones: growth hormone and oestrogen. Obviously, their biosynthesis and metabolism depend on numerous factors. The best known candidate genes include oestrogen receptor genes (*ESR-1*, *ESR-2*), genes encoding the key enzymes for oestrogen biosynthesis (*CYP-19*, *CYP-17*) and genes mediating growth hormone activity (*IGF1*) [4, 28]. The results of investigations of genes that participate in regulating the activity of the GH/IGF1 system have, nevertheless, failed to provide firm evidence supporting their association with inheritance of height [14, 29]. On the other hand, the contribution of genes affecting the biosynthesis and metabolism of female hormones to natural height variability observed in the general population seems to be more likely, since mutations encountered in these genes are responsible for phenotypic pathologies. In such situations, a depressed oestrogen level is noted and in consequence individuals affected by such genetic abnormalities are characterised by very tall stature. Deletion of some regions of the Y chromosome, the so-called GCY (growth control Y), manifests as short stature in males [4, 7]. Moreover, it is possible that the distinct sexual dimorphism commonly observed in the population may result from the activity of oestrogen, as well as genes situated on the Y chromosome [7]. Research has demonstrated a clear association of the *ESR-2* gene with height in females [28], while height in males is evidently affected by the *ESR-1* gene [4]. In addition, a strong correlation with height in females has been detected in the case of the *CYP-19* gene [28], which may be explained by a significant effect of oestrogen on metabolism in females. This observation,

however, contrasts with investigations carried out by Ellis et al. [7], who demonstrated a significant statistical correlation between the aromatase encoding gene and height in males. Investigators surmise that the relation may be a consequence of the interaction of aromatase with other factors affecting the growth of long bones, which are generally longer in males as compared to females. It is assumed that the lack of reproducibility of studies most likely results from the inadequate size of population samples, poor methods of association detection and a small individual effect of a single gene in the total population variability [4, 5, 15].

Performed investigations indicate that genetic variants responsible for disease syndromes may also shape natural population variability. A well-known example is provided by human pigmentation genes. Variants of such genes as *OCA2*, *SLC45A2* and *TYRP1* have been identified; these are responsible for determining various types of albinism, while at the same time other polymorphisms within the same genes are responsible for physiological variability of the pigmentation phenotype. Investigations of pathological short stature in children have provided data pointing to an association of this defect with chromosome 12, and in particular with the vitamin D receptor (VDR) gene situated in this region. The receptor is indispensable in the activity of the active form of vitamin D, which is of considerable importance for maintaining calcium homeostasis in the body. It turns out that the identified polymorphic alterations within the gene are also associated with normal height variability in the population [5]. Researchers point to the fact that the *RANK* gene may also be involved in height determination [3]. This gene is listed as a candidate gene, since, by encoding the receptor that activates nuclear factor NF- κ B, it participates in regulating the process of maturation and differentiation of osteoclasts, or – in other words – cells that are characteristic for bone tissue. Statistically significant associations have been demonstrated between height and several polymorphisms situated in the NF- κ B intron regions.

From recent investigations it transpires that association with height inheritance is manifested by numerous regions scattered around practically all autosomes and sex chromosomes [24]. Their unequivocal identification is considerably hindered by the fact that they constitute genetic variants with small effect size. It is estimated that each may explain a minor percentage of height variation in the human population. A promising solution seems to be GWAS (genome wide association study), which allows simultaneous analysis of approximately one million genetic polymorphisms [23]. Such investigations are possible mostly thanks to the use of

DNA microarray technology. The philosophy that provides the background for such studies takes into consideration the phenomenon of linkage disequilibrium between two closely situated polymorphisms. The analysis of an adequate number of SNP polymorphisms, whose location allows uniform coverage of all human chromosomes, may allow detection of a signal associated with the investigated phenotypic trait for particular regions of the genome. Further, more detailed studies make it possible to more precisely pinpoint the location of the genome fragment with which phenotype trait inheritance is associated. GWAS allows detection of common alleles characterised by a moderate or small size of effect upon population genetic variation. The first success of these investigations was detection of SNP polymorphisms within the *HMG2* gene, which are strongly associated with height [26]. It has been demonstrated that there are particular gene variants that increase the height of their carrier by approximately 0.4 cm. Earlier experiments performed in human patients and in animals have proven that many rare growth disturbances result from serious mutations of the *HMG2* gene. The results have been confirmed by independent research teams, which have additionally demonstrated the presence of a strong association between height and the *GDF5* and *UQCC* genes [9, 15, 20, 25]. These genes play an important role in the process of growth and development of cartilages, bones and joints. Investigators have observed that having one of the alleles in the *GDF5* gene decreases height and predisposes affected individuals to an increased risk of osteitis. The disadvantageous genetic variant decreases the production of *GDF5* protein, which in consequence leads to restricting bone growth. As the presented data show, the *HMG2* and *GDF5-UQCC* genes account for as little as 0.3–0.7% of general height variability [15, 20]. In addition, the GWAS-type studies have provided evidence pointing to an association between height and numerous other genes that trigger changes in the skeletal system (*BMP2*, *BMP6*, *EFEMP1*, *FBLN5* and *NOG*, as well as genes encoding the ADAMTS family of enzymes), mitosis-associated genes (*HMG1*, *NCAPG*, *CDK6*, *COIL*, *SCMH1*) or transcription-regulating genes (*HHIP*, *IHH*) [9, 25]. Recent reports also indicate that genes involved in regulation of chromatin structure (*ZBTB38*, *DOTIL*) are implicated in height determination, although the underlying mechanism has not been elucidated [9, 15, 25].

Assuming the model of genes operating in an additive manner, genetic polymorphisms so-far identified by GWAS are responsible for at most 3–4% of natural height variability in the human population [9, 15, 25].

However, detection of height alleles accounting for a small effect size is associated with some problems. The difficulties result from the fact that the genuine association signal is often obscured by statistical noise resulting from an immense number of markers that are not associated with a given trait. Hence, to eliminate the risk of false positive results, the significance level is maintained extremely low. Then, in turn, a danger arises of missing genuine variants, which affect variability to a very small degree only. A solution to this problem is a considerable increase in the size of population sample, so that it includes hundreds of thousands of individuals. Thus, it appears that the future of association studies (at least at the initial stage, which allows localisation of regions or candidate genes) belongs to large research consortia, which would be capable of coping with the logistics-related challenges [23]. Wray et al. [27] suggest that correct detection of a genotype-phenotype association may be facilitated by an analysis of extremely large populations or by combining results of various studies. Moreover, it has been suggested that non-additive interactions between genes or environmental factors may also be involved in the genetic background of height inheritance [15, 25]. As a consequence of epistatic interactions between two genes, the final effect may be – but does not at all have to be – a sum of effects of each gene taken separately. In the GWAS-type studies, epistatic interactions are very difficult to identify. Appropriate statistical tools are needed; these tools are constantly being improved. A review of available statistical methods that allow genetic interactions to be analysed may be found in review papers focusing on this problem [e.g. 11, 17, 18, 19]. The final stage of investigations into genotype-phenotype relations continues to be functional analyses of such genetic variants that are strongly suspected of being responsible for a genuine biological effect.

3. Summary

It cannot be ruled out that physiological determination of height variability is affected by rare alleles with large effect size or else large insertions and deletions termed “copy number polymorphisms” (CNP) that are common within the genome [15, 25]. Unfortunately, so far they have escaped detection by contemporary research techniques. Possibly, height prediction will require analysis of hundreds of SNPs, which will considerably hinder routine employment of this type of test. For the time being, it is necessary to continue elementary investigations, which may develop in various

directions. Continuing GWAS-type studies seems advisable, but they should be performed on samples with a relatively uniform genetic past.

For thousands of years, natural selection has favoured “better”, more beneficial variants and reduced the frequency of less desirable variants in a given ecological niche, thus leading to significant genetic variation. In view of this inter-population variability, one may not assume that the same genetic variants remain associated with height in all human populations. Studies carried out in European and East Asian populations indicate the presence of separate genetic height regulating mechanisms that differentiate both population groups [12]. Hence, it is necessary to perform studies of separate, uniform population samples. It has been suggested that a certain, possibly even a significant role in the final shaping of some phenotypic traits may be fulfilled by epigenetic information, inherited in a non-genetic manner, e.g. through DNA methylation. Epigenetic modifications may affect regulation of gene expressions *via* chemical modification of DNA and histone proteins in methylation (gene suppression) or acetylation (gene activation) processes, as well as through RNA interference (RNAi) [21]. Unfortunately, to date, epigenetic variation continues to remain very poorly understood. Most assuredly, it would be worthwhile thoroughly investigating the role of gene-gene, gene-environment and gene-epigenetic factor interactions in determining height in humans. Increasingly efficient statistical tools allow a more precise assessment of even complex effects of this type. It might thus be assumed that the dynamic development of research technologies and new analytical procedures will lead to the unmasking of the genetic background of height inheritance. Knowledge about the effect of particular factors and their interactions on natural variability in human height may possibly allow prediction of this phenotypic trait, which would doubtlessly provide us with a useful tool in forensic examinations.

References

1. Butler M. J., Forensic DNA typing. Biology, technology, and genetics of STR markers, Elsevier Academic Press, Amsterdam 2005.
2. Branicki W., Brudnik U., Kupiec T. [et al.], Determination of phenotype associated SNPs in the *MC1R* gene, *Journal of Forensic Science* 2007, 52, 349–354.
3. Chen Y., Xiong D. H., Yang T. L. [et al.], Variations in RANK gene are associated with adult height in Caucasians, *American Journal of Human Biology* 2007, 19, 559–565.

4. Dahlgren A., Lundmark P., Axelsson T. [et al.], Association of the estrogen receptor 1 (ESR1) gene with body height in adult males from two Swedish population cohorts, *PLoS ONE* 2008, 3, e1807.
5. Dempfle A., Wudy S. A., Saar K. [et al.], Evidence for involvement of the vitamin D receptor gene in idiopathic short stature via a genome-wide linkage study and subsequent association studies, *Human Molecular Genetics* 2006, 15, 2772–2783.
6. 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.
7. Ellis J. A., Stebbing M., Harrap S. B., Significant population variation in adult male height associated with the y chromosome and the aromatase gene, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001, 86, 4147–4150.
8. Grimes E. A., Noake P. J., Dixon L. [et al.], Sequence polymorphism in the melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype, *Forensic Science International* 2001, 122, 124–129.
9. Gudbjartsson D. F., Bragi Walters G., Thorleifsson G. [et al.], Many sequence variants affecting diversity of adult human height, *Nature Genetics* 2008, 40, 609–615.
10. Hirschhorn J. N., Lindgren C. M., Daly M. J. [et al.], Genomewide linkage analysis of stature in multiple populations reveals several regions with evidence of linkage to adult height, *American Journal of Human Genetics* 2001, 69, 106–116.
11. Hoh J., Ott J., Mathematical multi-locus approaches to localizing complex human trait genes, *Nature Genetics* 2003, 4, 701–709.
12. Hur Y. M., Kaprio J., Iacono W. G. [et al.], Genetic influences on the difference in variability of height, weight and body mass index between Caucasian and East Asian adolescent twins, *International Journal of Obesity* 2008, 32, 1455–1467.
13. Jepson A., Banya W., Hassan-King M. [et al.], Twin children in the Gambia: evidence for genetic regulation of physical characteristics in the presence of sub-optimal nutrition, *Annals of Tropical Paediatrics*, 1994, 14, 309–313.
14. Lettre G., Butler J. L., Ardlie K. G. [et al.], Common genetic variation in eight genes of the GH/IGF1 axis does not contribute to adult height variation, *Human Genetics* 2007, 122, 129–139.
15. Lettre G., Jackson A. U., Gieger C. H. [et al.], Identification of ten loci associated with height highlights new biological pathways in human growth, *Nature Genetics* 2008, 40, 584–591.
16. Luo Z. C., Albertsson-Wikland K., Karlberg J., Target height as predicted by parental heights in a population-based study, *Pediatric Research* 1998, 44, 563–571.
17. Moore J. H., Computational analysis of gene-gene interactions using multifactor dimensionality reduction, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2004, 4, 795–803.
18. Moore J. H., The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases, *Human Heredity* 2003, 56, 73–82.
19. 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.
20. Sanna S., Jackson A. U., Nagaraja R., [et al.], Common variants in the GDF5-UQCC region are associated with variation in human height *Nature Genetics* 2008, 40, 198–203.
21. Scarino M. L., A sideways glance. Do you remember your grandmother's food? How epigenetic changes transmit consequences of nutritional exposure from one generation to the next, *Genes & Nutrition* 2008, 3, 1–3.
22. 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, *The American Journal of Human Genetics* 2008, 82, 424–431.
23. Visscher P. M., Sizing up human height variation, *Nature Genetics* 2008, 40, 489–490.
24. Visscher P. M., Macgregor S., Benyamin B. [et al.], Genome partitioning of genetic variation for height from 11,214 sibling pairs, *The American Journal of Human Genetics* 2007, 81, 1104–1110.
25. Weedon M. N., Lango H., Lindgren C. M. [et al.], Genome-wide association analysis identifies 20 loci that influence adult height, *Nature Genetics* 2008, 40, 575–583.
26. 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.
27. Wray N. R., Goddard M. E., Visscher P. M., Prediction of individual genetic risk of complex disease, *Current Opinion in Genetics & Development* 2008, 18, 257–263.
28. Yang T. L., Xiong D. H., Guo Y. [et al.], Association analyses of *CYP19* gene polymorphisms with height variation in a large sample of Caucasian nuclear families, *Human Genetics* 2006, 120, 119–125.
29. Yang T. L., Xiong D. H., Guo Y. [et al.], Comprehensive association analyses of *IGF1*, *ESR2* and *CYP17* genes with adult height in Caucasians, *European Journal of Human Genetics* 2008, 16, 1380–1387.

Corresponding author

Magdalena Marcińska
Instytut Ekspertyz Sądowych
ul. Westerplatte 9
PL 31-033 Kraków
e-mail: mmarcinska@ies.krakow.pl

PERSPEKTYWY POSZUKIWANIA GENETYCZNYCH MARKERÓW WZROSTU DLA CELÓW SĄDOWYCH

1. Wstęp

Obecnie w genetyce sądowej standardowo stosuje się analizę polimorficznych, niekodujących sekwencji DNA, w tym mikrosatelitarnego DNA jądrowego (STR) oraz superzmiennych regionów DNA mitochondrialnego. Mikrosatelity stanowią krótkie, 2–6 nukleotydowe powtarzające się sekwencje DNA jądrowego. Cechują się one wysoką zmiennością wynikającą z różnej liczby powtórzeń charakterystycznego motywu, co czyni z tych markerów doskonałe narzędzie do identyfikacji osobniczej. Wysokie wartości siły dyskryminacji uzyskiwane przy analizie zaledwie 10–15 markerów typu STR, a także względna łatwość analizy prostych mieszanin DNA, dodatkowo przemawiają na korzyść zastosowania wspomnianych markerów do badań identyfikacyjnych [1]. W rutynowych analizach śladu biologicznego stosuje się najczęściej zestaw SGM Plus zawierający dziesięć *loci* STR i dodatkowo marker amelogeniny pozwalający na oznaczenie płci. Natomiast w badaniach identyfikacyjnych szczątków ludzkich czy w sprawach o ustalanie ojcostwa konieczne jest zwiększenie panelu markerów polimorficznych, co umożliwi zastosowanie dodatkowych zestawów. Do badań DNA o znacznym stopniu zdegradowania coraz częściej stosuje się sekwencje mikrosatelitarne o krótkich ampliconach, tzw. miniSTR. W badaniach męskiego DNA (np. w sprawach gwałtów) z powodzeniem stosuje się analizę polimorficznych markerów chromosomu Y dziedziczonych w linii ojcowskiej. Znajdują one również zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa, gdy dziecko jest płci męskiej, jak również przy identyfikacji szczątków ludzkich, gdy dysponuje się materiałem porównawczym z linii męskiej. Badania chromosomu Y okazały się również niezwykle przydatnym genetycznym wskaźnikiem przy ustalaniu pochodzenia etnicznego. Dodatkowym markerem identyfikacyjnym jest mitochondrialny DNA dziedziczony w linii matczynej. Analiza tego markera okazuje się szczególnie cenna w przypadku trzonu włosów oraz bardzo silnie zdegradowanego materiału, głównie szczątków ludzkich [1].

Wydaje się, że przyszłość badań w genetyce sądowej wiąże się z analizą informatywnych polimorfizmów typu SNP pozwalających na charakterystykę fenotypu człowieka na podstawie takich cech, jak pigmentacja, wzrost czy masa ciała. Przewidywanie wyglądu fizycznego sprawcy przestępstwa poprzez analizę sekwencji DNA w śladach biologicznych pozostawionych na miejscu zdarzenia zdecydowanie ułatwiłoby pracę organom ścigania. Niejednokrotnie, zwłaszcza w przypadku fenotypów skrajnych, jego predykcja pozwoliłaby śledczym zawęzić

krąg podejrzanych i szybciej zidentyfikować sprawcę przestępstwa. Genetyczna predykcja cech fenotypowych mogłaby również być użyteczna jako uzupełnienie badań antropologicznych szczątków ludzkich. Jak dotąd, w aspekcie sądowym prowadzone są badania nad pigmentacją człowieka. Przyniosły one pierwsze pozytywne efekty w postaci testów sądowych do przewidywania rudego koloru włosów [2, 8]. Postęp, jaki zanotowano ostatnio w badaniach nad kolorem oczu, być może doprowadzi również wkrótce do praktycznego zastosowania tej wiedzy na szerszą skalę [6, 22]. Jedną z prywatnych firm już wprowadziła pierwszy test umożliwiający predykcję koloru tęczówki oka (www.dnaprint.com).

Bez wątplenia jedną z najbardziej wyrazistych cech łatwo rozpoznawalnych przez świadków zdarzenia kryminalnego jest wzrost. Od dawna przyjmuje się, że wzrost jest typową cechą o dziedziczeniu wielogenowym z dodatkowym wpływem czynników środowiskowych oraz interakcji pomiędzy tymi zmiennymi. Badania nad bliźniętami, rodzinne i adopcyjne, sugerują, że 70–90% zmienności tej cechy można wyjaśnić wpływami genetycznymi [10, 16, 26]. Lepsze warunki życia, dieta bogatsza w składniki odżywcze, doprowadziły w kolejnych pokoleniach do stopniowego zwiększania się średniego wzrostu ludzi. Niemniej jednak czynniki genetyczne nadal pozostają nadrzędną determinantą wzrostu, czego świetną ilustracją były przeprowadzone w Gambii badania nad niedożywionymi dziećmi, które dowiodły znaczącego wpływu genów na naturalną regulację wzrostu nawet przy ograniczonym dostępie pożywienia [13]. Przypuszcza się, że kontrolujących wzrost u człowieka genów może być bardzo wiele, a każdy z nich tylko w niewielkim stopniu wpływa na jego zmienność fenotypową w zakresie wzrostu człowieka w populacji generalnej.

2. Badania nad genetyczną determinacją wzrostu

Populacyjne badania asocjacyjne uznawane są za najbardziej efektywne narzędzie do wykrywania wariantów genetycznych o umiarkowanym wpływie na właściwości fenotypowe. W poszukiwaniu „genów wzrostu” początkowo uwaga badaczy skoncentrowała się przede wszystkim na tzw. genach kandydujących, odgrywających zasadniczą rolę w procesie wzrostu i rozwoju kości. Wzrost człowieka jest kontrolowany przez dwa podstawowe hormony: hormon wzrostu i hormony z grupy estrogenów. Oczywiście, ich biosynteza i metabolizm zależy od wielu czynników. Do najlepiej poznanych genów kandydujących należą geny kodujące receptory estrogenowe i

(*ESR-1*, *ESR-2*), geny kodujące kluczowe dla biosyntezy estrogenów enzymy (*CYP-19*, *CYP-17*) oraz geny pośredniczące w działaniu hormonu wzrostu (*IGF1*) [4, 28]. Wyniki badań nad genami uczestniczącymi w regulacji działania układu *GH/IGF1* nie zdołały jednak dostarczyć jednoznacznych dowodów potwierdzających ich związek z dziedziczeniem wzrostu [14, 29]. Natomiast udział genów wpływających na biosyntezę i metabolizm żeńskich hormonów w naturalnej zmienności wzrostowej w populacji wydaje się bardziej prawdopodobny, ponieważ stwierdzone w ich obrębie mutacje odpowiadają za patologie fenotypowe. Obserwujemy wówczas zmniejszony poziom estrogenów w organizmie i w konsekwencji osobnicy dotknięci takimi zmianami genetycznymi charakteryzują się bardzo wysokim wzrostem. Stwierdzono również, że delecja pewnych regionów chromosomu Y zwanych *GCY* (ang. growth control Y) manifestuje się niskim wzrostem mężczyzn [4, 7]. Co więcej, nasuwa się spostrzeżenie, że występujący powszechnie w populacji wyraźny dymorfizm płciowy może wynikać właśnie z działalności estrogenów, jak też i genów zlokalizowanych na chromosomie Y [7]. Przeprowadzone badania wykazały wyraźną asocjację genu *ESR-2* ze wzrostem u kobiet [28], zaś w przypadku wzrostu mężczyzn obserwuje się wyraźny wpływ genu *ESR-1* [4]. Ponadto silną korelację ze wzrostem u kobiet wykryto dla genu *CYP-19* [28], co można tłumaczyć znaczącym wpływem estrogenów na metabolizm organizmu kobiety. Ta obserwacja stoi jednak w sprzeczności z badaniami Ellis i in. [7], które wykazały istotny statystycznie związek pomiędzy genem kodującym aromatazę a wzrostem u mężczyzn. Naukowcy przypuszczają, że może to wynikać z interakcji aromatazy z innymi czynnikami wpływającymi na wzrost kości długich, które u mężczyzn są generalnie dłuższe niż u kobiet. Przyjmuje się, że brak powtarzalności badań najprawdopodobniej wynika z niewystarczającej wielkości prób populacyjnych, słabych metod detekcji asocjacji, jak i niewielkiego indywidualnego efektu pojedynczego genu w całkowitej zmienności populacyjnej [4, 5, 15].

Z przeprowadzonych badań wynika, że warianty genetyczne odpowiedzialne za syndromy chorobowe mogą również kształtować naturalną zmienność populacyjną. Dobrze znanym przykładem są choćby geny związane z pigmentacją u człowieka. Zidentyfikowano warianty genów *OCA2*, *SLC45A2*, *TYRP1*, które odpowiedzialne są za determinację różnych wariantów albinizmu, a jednocześnie inne polimorfizmy w obrębie tych samych genów odpowiadają za fizjologiczną zmienność fenotypu pigmentowego. Badania nad patologicznie niskim wzrostem u dzieci dostarczyły danych wskazujących na związek tego defektu z chromosomem 12, a w szczególności zlokalizowanym w tym regionie genem *VDR* kodującym receptor witaminy D. Receptor ten jest niezbędny w mechanizmie działania aktywnej formy witaminy D, która

ma ogromne znaczenie dla utrzymania homeostazy gospodarki wapniowej w organizmie. Okazuje się, że zidentyfikowane zmiany polimorficzne w tym genie są również związane z normalnym zróżnicowaniem wzrostu w populacji [5]. Badacze wskazują, że w determinację wzrostu może być również zaangażowany gen *RANK* [3]. Wymienia się go jako gen kandydujący, jako że kodując receptor aktywujący jądrowy czynnik NF- κ B, uczestniczy w regulacji procesu dojrzewania i różnicowania osteoklastów, czyli komórek charakterystycznych dla tkanki kostnej. Wykazano statystycznie istotne asocjacje ze wzrostem kilku polimorfizmów zlokalizowanych w jego regionach intronowych.

Z ostatnich badań wynika, że z dziedziczeniem wzrostu związanych jest wiele regionów rozproszonych w praktycznie wszystkich autosomach i chromosomach płci [24]. Dużym utrudnieniem w ich jednoznacznej identyfikacji jest fakt, że są to warianty genetyczne mające niewielki wpływ na zmienność (ang. small effect size). Szacuje się, że każdy z nich może wyjaśniać niewielki procent wariacji we wzroście w populacji ludzkiej. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie badań asocjacyjnych obejmujących cały genom człowieka (ang. genome wide association study, GWAS) dających możliwość jednoczesnej analizy ponad miliona polimorfizmów genetycznych [23]. Badania takie są możliwe przede wszystkim dzięki zastosowaniu technologii mikromacierzy DNA. Filozofia tych badań uwzględnia zjawisko nierównowagi sprzężeń (ang. linkage disequilibrium) pomiędzy blisko położonymi polimorfizmami. Analiza odpowiedniej liczby polimorfizmów SNP o lokalizacji, która zapewnia równomierne pokrycie wszystkich chromosomów człowieka, może pozwolić na wykrycie sygnału związanego z badaną cechą fenotypową dla poszczególnych regionów genomu. Dalsze, bardziej szczegółowe badania, umożliwiają bardziej precyzyjną lokalizację fragmentu genomu, z którym związane jest dziedziczenie cechy fenotypowej. Badania GWAS pozwalają na wykrycie powszechnych alleli o średnim bądź niewielkim wpływie na zróżnicowanie genetyczne populacji. Pierwszym sukcesem tych badań było wykrycie polimorfizmów SNP w obrębie genu *HMGA2* pozostających w silnej asocjacji ze wzrostem [26]. Wykazano, że istnieją określone warianty genów podnoszące wzrost ich nosiciela o ok. 0,4 cm. Wcześniejsze doświadczenia na pacjentach i zwierzętach dowiodły, że wiele rzadkich zaburzeń wzrostu jest wynikiem poważnych mutacji w genie *HMGA2*. Wyniki tych badań zostały potwierdzone przez niezależne zespoły badawcze, które dodatkowo wykazały silny związek ze wzrostem genów *GDF5* i *UQC* [9, 15, 20, 25]. Odgrywają one ważną rolę w procesie wzrostu i rozwoju chrząstki, kości i stawów. Naukowcy odkryli, że posiadanie jednego z alleli w genie *GDF5* obniża wzrost i predisponuje osobników do zwiększonego ryzyka zapalenia kości. Niekorzystny wariant genetyczny zmniejsza pro-

dukcję białka *GDF5*, co w konsekwencji prowadzi do ograniczenia wzrostu kości. Z przedstawionych danych wynika, że geny *HMG2* i *GDF5-UQCC* tłumaczą zaledwie 0,3–0,7% ogólnej zmienności wzrostowej [15, 20]. Badania typu *GWAS* dostarczyły ponadto dowodów na asocjację ze wzrostem wielu innych genów wpływających na zmiany w układzie kostnym (geny *BMP2*, *BMP6*, *EFEMP1*, *FBLN5*, *NOG*, oraz geny kodujące enzymy z rodziny *ADAMTS*), związanych z procesem mitozy (*HMG1*, *NCAPG*, *CDK6*, *COIL*, *SCMH1*) czy też genów regulujących transkrypcję (*HHIP*, *IHH*) [9, 25]. Ostatnie doniesienia wskazują ponadto na udział w determinacji wzrostu genów zaangażowanych w regulację struktury chromatyny (*ZBTB38*, *DOT1L*), choć mechanizm leżący u podstaw tego oddziaływania nie jest znany [9, 15, 25].

Zakładając addytywny model działania genów, zidentyfikowane dotychczas w badaniach typu *GWAS* polimorfizmy genetyczne odpowiadają za najwyżej 3–4% naturalnej zmienności we wzroście w populacji ludzkiej [9, 15, 25]. Wykrywanie w badaniach asocjacyjnych alleli wzrostowych odpowiadających za niewielki efekt wiąże się jednak z pewnymi trudnościami. Wynikają one z faktu, że autentyczny sygnał asocjacji bywa łatwo zagłuszony statystycznym szumem powodowanym olbrzymią liczbą markerów niezwiązanych z daną cechą. Stąd też, by wyeliminować ryzyko uzyskania wyników fałszywie dodatnich, utrzymuje się próg istotności na niezwykle niskim poziomie. Wtedy z kolei pojawia się niebezpieczeństwo pominięcia wariantów prawdziwych, ale w niewielkim stopniu wpływających na zmienność. Rozwiązaniem tego problemu jest zdecydowane zwiększenie próby populacyjnej do setek tysięcy osobników. Wydaje się zatem, że przyszłość badań asocjacyjnych (przynajmniej na wstępnym etapie pozwalającym na zlokalizowanie regionów lub genów kandydujących) należy do wielkich konsorcjów badawczych, które byłyby w stanie podołać wyzwaniu natury logistycznej [23]. Wray i in. [27] sugerują, że prawidłowe wykrycie korelacji genotyp-fenotyp może ułatwić analiza bardzo dużych populacji lub też łączenie wyników różnych badań. Ponadto sugeruje się, że w podłożu genetyczne dziedziczenia wzrostu mogą być również zaangażowane mechanizmy interakcji pomiędzy genami o charakterze nieaddytywnym czy też czynnikami środowiskowymi [15, 25]. W wyniku oddziaływań epistatycznych pomiędzy dwoma genami efekt końcowy może, ale wcale nie musi, być sumą efektów każdego genu wziętego z osobna. W badaniach typu *GWAS* interakcje epistatyczne są bardzo trudne do zidentyfikowania. Potrzebne są odpowiednie narzędzia statystyczne, które wciąż są udoskonalane. Przegląd dostępnych metod statystycznych umożliwiających analizę interakcji genetycznych zainteresowani mogą znaleźć w pracach przeglądowych poświęconych temu zagadnieniu [np. 11, 17, 18, 19]. Końcowym eta-

pem badań nad analizą powiązań genotyp-fenotyp pozostają analizy funkcjonalne nad wariantami genetycznymi, co do których istnieją silne podejrzenia, że są one odpowiedzialne za rzeczywisty efekt biologiczny.

3. Podsumowanie

Nie można wykluczyć, że w determinacji fizjologicznej zmienności wzrostu udział mają rzadkie allele o dużym efekcie działania czy też szeroko rozpowszechnione w genomie duże insercje i delecje zwane polimorfizmami liczby kopii (ang. copy number polymorphisms, CNP) [15, 25]. Niestety na razie pozostają one nieuchwytnie dla współczesnych technik badawczych. Być może predykcja wzrostu wymagała będzie analizy setek pozycji typu SNP, co znacznie utrudni rutynowe zastosowanie tego typu testów. Na razie jednak konieczne jest kontynuowanie badań podstawowych, które mogą postępować w różnych kierunkach. Wskazane wydaje się kontynuowanie badań typu *GWAS*, ale na próbkach o względnie jednorodnej przeszłości genetycznej.

Na przestrzeni tysięcy lat selekcja naturalna faworyzowała „lepsze”, korzystniejsze warianty i redukowała częstotliwość tych mniej pożądaných w danej niszy ekologicznej, prowadząc do istotnego zróżnicowania genetycznego. W wyniku owej zmienności międzypopulacyjnej nie można zakładać, że takie same warianty genetyczne pozostają w asocjacji ze wzrostem we wszystkich populacjach ludzkich. Przeprowadzone badania na populacjach europejskiej i wschodnioazjatyckiej wskazują na istnienie odrębnych genetycznych mechanizmów regulacji wzrostu pomiędzy obiema grupami populacyjnymi [12]. Stąd też konieczne jest prowadzenie badań dla oddzielnych, jednolitych próbek populacyjnych. Sugeruje się, że pewną, a może nawet znaczącą rolę w ostatecznym kształtowaniu niektórych cech fenotypowych organizmu, mogą odgrywać informacje epigenetyczne, a więc dziedziczone pozagenowo np. poprzez metylację DNA. Modyfikacje epigenetyczne mogą wpływać na regulację ekspresji genów poprzez chemiczne modyfikacje DNA oraz białek histonowych w procesach metylacji (supresja genów) czy acetylacji (aktywacja genów), a także poprzez zjawisko interferencji RNA (RNAi) [21]. Niestety zmienność epigenetyczna na razie pozostaje bardzo słabo zbadana. Warto wreszcie z pewnością dokładnie zbadać znaczenie interakcji typu gen – gen, gen – środowisko, gen – czynnik epigenetyczny w determinacji wzrostu u człowieka. Coraz doskonalsze narzędzia statystyczne pozwalają na bardziej precyzyjną ocenę nawet skomplikowanych efektów tego typu. Można zatem przypuszczać, że postępujący błyskawicznie rozwój technologii badawczych i nowych procedur analitycznych odsłoni genetyczne tło dziedziczenia wzrostu. Znajomość wpływu poszczególnych czynników i interakcji między nimi

na naturalną zmienność we wzroście człowieka być może pozwoli na przewidywanie tej cechy fenotypowej, co stałoby się z pewnością użytecznym narzędziem w badaniach sądowych.