

## A STUDY OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THE MC1R GENE

Patrycja KULWIKOWSKA<sup>1</sup>, Krzysztof TALARCZYK<sup>2</sup>, Ryszard PAWŁOWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Department of Obstetrics, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland*

<sup>2</sup> *Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland*

### Abstract

Prediction of appearance based on genetic analysis is a very attractive prospect for forensic science. That is why trends towards researching those areas of DNA that are or may be highly associated with the phenotypic appearance of a person (pigmentation of the skin, hair and eye colour, height or body type) are more and more clearly visible in forensic genetics. It has been known for over 15 years that red hair colour is mainly related to variability in the gene of melanocortin receptor I. However, there have been no studies on the polymorphism of this gene in the northern Polish population. This paper presents a polymorphism study of the MC1R gene in a population of 100 persons of both sexes from this area. Hairs were analyzed by optical microscopy, assessing their morphological characteristics. DNA was isolated from mouth swabs and hair roots using the organic method. DNA was amplified using primers that are complementary to the genes of MC1R and amelogenin in multiplex PCR reactions. PCR products were minisequenced using appropriate primers. Eighteen people out of 95 had reddish hair colour. The relationship between SNP polymorphisms and the occurrence of reddish hair colour was examined.

### Key words

MC1R; SNP polymorphism; RHC phenotype; Red hair colour.

*Received 3 April 2013; accepted 26 August 2013*

### 1. Introduction

The correlation between genotype and phenotype is the subject of very intensive research which is being carried out by scientists from a range of specializations – not just by forensic geneticists.

A genetic profile of an offender obtained from an analysis of biological traces can be a source of valuable information about the physical characteristics of this person. This type of information would be particularly important in the absence of a suspect or in the event of conflicting testimony of witnesses concerning the appearance of the perpetrator. Eye and hair colour and type of skin are features that are easily recognizable and characteristic for a person, and therefore prediction of these features seems to be valuable for forensic medicine.

Pigmentation as a quantitative trait is difficult to analyze because it has been suggested that more than 120 genes are involved in its determination [3, 4, 16]. Up till now, only a few have been found to affect the amount of melanin in the body. The best studied gene responsible for pigmentation is MC1R (16q24.3) (951 bp long), encoding melanocortin receptor type I [17, 18, 21]. This receptor is associated with the cell membrane of melanocytes. Its activation by melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) leads to increased cAMP levels, resulting in increased synthesis of eumelanin (dark colour – blue or brown), and reducing the amount of pheomelanin produced (light colour – yellow or red) [3, 15, 19, 21].

There are dozens of different alleles of the MC1R gene, some of which are described as reducing func-

tionality or affecting the expression of the membrane receptor of melanocytes, and are linked with overproduction of pheomelanin, which manifests itself in the RHC (red hair colour) phenotype. Individuals with the RHC phenotype are characterized by reddish-brown hair colour, pale skin, sensitivity to ultraviolet light (Type I skin according to the Fitzpatrick Scale) and the presence of freckles [8, 10, 11, 19].

Alleles of the MC1R gene have been divided into two groups: those strongly predisposing to the RHC phenotype, denoted R, and those with a lower degree of correlation with this phenotype – r [3, 6, 8, 9, 10].

Originally, the first group included four SNP mutations: C252, C451T, C478T and G880C, and later it was extended by G425 and missense mutations – 89insA. The r category includes: G178T, G274A, G488A, and T464C. Functional studies have confirmed that the mutations: G425 C451T, C478T and G880C significantly lower the efficiency of the receptor [2, 3], but the mechanism of action of these mutations is not fully understood and may vary significantly depending on the polymorphism.

The RHC phenotype is inherited as recessive, but the effect of mutation is quantitative, which means that heterozygous individuals carrying one mutant allele and one normal one can have light skin, reddish hair and freckles, and additionally in men this system of alleles may manifest in a reddish beard. Homozygotes with two mutated alleles R or complex heterozygous R/R usually have the RHC phenotype. The most numerous in the population are C451T and C478T mutations, and these two polymorphic sites have the greatest impact on the occurrence of the RHC phenotype in populations of northern Europe. However, in the Italian population, homozygotes having two mutant alleles R with no RHC phenotype were observed [11], which is probably associated with the masking effect of the other genes.

The aim of this study was to determine the frequency of occurrence of polymorphisms of the MC1R gene responsible for the red colour of hair in a sample of the northern Polish population and their usefulness in determining reddish hair colour.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

Hairs and mouth swabs were collected from 100 people of both sexes living in northern Poland. Persons were selected to represent men and women with maximum possible hair colours occurring in the analyzed population.

Hair colour evaluation was carried out by macroscopic and microscopic observations, and colour was divided into six categories (red, reddish strawberry blond, blond, dark blond, brown and black hair), based on archetypes of colours described in the “Atlas of hair” [17].

Evaluations of eye colour and type of skin were carried out during sampling. Hairs subjected to hair-dressing treatments that could lead to a change of hair colour were not collected. Eye colour was defined as blue, green, hazel or brown. Skin type was assessed on the basis of the Fitzpatrick Scale of skin sensitivity to sunlight:

- type I – skin that is easily burned, never tans. The normal reaction to sunlight is erythema;
- type II – skin that is easily burned and hard to tan. The first reactions to the sun are erythema and redness, then gradually progressing skin pigmentation. There is not a high degree of tanning, but it is visible;
- type III – skin which is relatively resistant to burning and pigments easily. The first response to sun is slight erythema that quickly gives way to a significant and visible tan;
- type IV – the skin is never burned and always tans well. The first rays of the sun cause strong pigmentation without erythema.

### 2.2. DNA isolation

#### 2.2.1. Isolation from hair roots

A 5 mm long section of hair containing the root was cut with a sterile scalpel and put into a 2 ml Eppendorf tube. Then 300 µl of TNCa buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2% SDS, 39 mM DTT and 0.025% proteinase K), 15 µl of proteinase K (2 mg/ml) and 10 µl of 1 M DTT were added. The mixture was vortexed and incubated at 56°C for 24 h. Then samples were vortexed and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. 400 µl of supernatant was added to 2 ml sterile tubes containing 400 µl of phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture, vortexed 3 minutes and centrifuged for 30 min at 13,000 rpm. Then, 400 µl of supernatant was added to 2 ml sterile tubes containing 750 µl of 99.9% alcohol and 30 µl of 3 M sodium acetate. Thus prepared samples were chilled at –20°C at least overnight to precipitate DNA. Extracts after precipitation were centrifuged for 25 min at 13,000 rpm. Supernatants were discarded, and the precipitates after drying at room temperature were resuspended in 16 µl Tris-HCl buffer pH 8.5.

### 2.2.2. Isolation from mouth swabs

The swab was placed in a 2 ml Eppendorf tube with 370  $\mu$ l TE buffer pH 8.0, 20  $\mu$ l of proteinase K (2 mg/ml) and 13  $\mu$ l of 20% SDS, vortexed and incubated for 24 h at 56°C. Then samples were vortexed and centrifuged for 10 min at 13,000 rpm. 400  $\mu$ l of supernatant was added to 2 ml sterile tubes containing 400  $\mu$ l of phenol:chloroform:isoamyl alcohol mixture, vortexed 3 minutes and centrifuged for 30 min at 13,000 rpm. Then, 400  $\mu$ l of supernatant was added to 2 ml sterile tubes containing 750  $\mu$ l of 99.9% alcohol and 30  $\mu$ l of 3 M sodium acetate. Thus prepared samples were chilled at -20°C at least overnight to precipitate DNA. Extracts after precipitation were centrifuged for 25 min at 13,000 rpm. Supernatants were discarded, and the precipitates after drying at room temperature were re-suspended in 16  $\mu$ l Tris-HCl buffer pH 8.5.

### 2.3. DNA quantification

DNA concentration measurements were performed using a fluorometric method with PicoGreen reagent (Molecular Probes) and Ascant FL fluorometer.

### 2.4. MC1R gene sequence analysis

#### 2.4.1. Multiplex PCR amplification method

DNA was amplified using primers complementary to the sequence of the MC1R gene and the amelogenin gene in multiplex PCR reactions (Table I). The reaction mixture consisted of: 5  $\mu$ l QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 0.5  $\mu$ l of the primers mixture (Table III), 2.5  $\mu$ l HPLC water and 2  $\mu$ l of template DNA at a concentration of 0.1–3 ng in a total reaction volume of 10  $\mu$ l. The reaction was carried out using the following temperature profile: 94°C/15 min (94°C/0.30 min,

63°C/1.30 min, 72°C/1.30 min) 34  $\times$ , 72°C/10 min, 4°C/ $\infty$ .

The reaction products were purified using an ExoSAP IT kit (Amersham Pharmacia, Freiburg, Germany) according to the manufacturer's instructions.

#### 2.4.2. Minisequencing reaction

Genotyping of tested SNPs was conducted using two multiplex reactions and the SNaPshot Multiplex Kit (ABI PRISM) in two multiplex reactions according to the manufacturer's instructions. Table II shows sequences of used PCR primers.

Multiplex reaction 1 was carried out in 5  $\mu$ l of mixture containing 2.5  $\mu$ l of SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1.2  $\mu$ l of primers mixture, 0.4  $\mu$ l of HPLC water and 0.9  $\mu$ l of the purified product of DNA amplification. Multiplex reaction 2 was carried out in 5  $\mu$ l of mixture containing 2.5  $\mu$ l of SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1.3  $\mu$ l of mixture of primers, 0.3  $\mu$ l of HPLC water and 0.9  $\mu$ l purified product of DNA amplification.

Positive and negative controls were run. The reaction products were purified using alkaline phosphatase from calf intestine (CIP, New England BioLabs), following the manufacturer's instructions.

### 2.5. Capillary electrophoresis

The products of minisequencing reactions were separated by capillary electrophoresis on an automated sequencer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. The reaction mixture contained: 12  $\mu$ l formamide, 0.2  $\mu$ l of the internal size standard GeneScan-120 LIZ minisequencing product. Electrophoresis was performed under conditions consistent with the instructions of the manufacturer of the SNaPshot Multiplex Kit (ABI PRISM).

TABLE I. DETAILS OF PCR PRIMERS USED FOR AMPLIFICATION [6]

DNA fragment	Sequence of primers 5' $\rightarrow$ 3'	Amplicon length	Concentration [ $\mu$ M]
1	MIF: TGGGCTCCCTCAACTCCACCC MIR: AGCAGGAGGATGACGGCCGTCT	268 bp	0.125
2	MIIIF: AGCTCCATGCTGTCCAGCCT MIIIR: AGCAGGACGGCCACGTGGT	193 bp	0.125
3	MIIIF: CTCACACTCATCGTCCTCTG MIIIR: TGCCCAGCACACTTAAAGC	206 bp	0.125
4	SXY1: CCCTGGGCTCTGTAAAGAAT SXY2: ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG	106/112 bp	0.25

TABLE II. EXTENSION PRIMERS USED FOR GENOTYPING OF THE MC1R AND AMELOGENIN SNP POLYMORPHISMS [6]

Multiplex 1				
Polymorphism	Neutral sequence 5'→3'	Target sequence 5'→3'	bp	Concentration [μM]
86insA	–	TGGGGCTGGCTGCCAA	16/16	0.8
C252A	–	CTGCCTGGCCTTGTCGGA	18/18	0.1
C451T	TCTGACAA	TCTCCATCTTCTACGCACTG	20/28	0.1
G425A	AAAGTCTGACAA	GCCATCGCCGTGGACC	16/28	0.025
C478T	AAAGTCTGACAA	ACAGCATCGTGACCCTGCG	20/32	0.1
G880C	ACGTCTGAAAGTCTGACA	CTGCAATGCCATCATC	16/36	0.05
Multiplex 2				
C456A		TTCTACGCACTGCGCTA	17/17	0.1
G178T		TGGTGGAGAACGCGCTGGTG	20/20	0.05
G488A		AGATGGCCGCAACGGCT	17/17	0.8
G274A	AAGTCTGACAA	TGGTGAGCGGGAGCAAC	17/28	0.2
T464C	CGTGAAAGTCTGACAA	CCGCGGCAGGGTACG	16/32	0.05
AMEL. C/T	AAAGTCTGACAA	GTTTCTCAAGTGGTCC	16/28	0.1

#### 2.4.4. Statistical analysis

Statistical analysis were performed using the Statistica Data Miner + QC and Logistic Regression Program Version 5.7.20. Statistical evaluation of the analyzed data was carried out using the  $\chi^2$  test and logistic regression.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Population data

The study involved 100 people from the northern Polish population. Full profiles were obtained for 95 samples. In the remaining five, the amount of isolated DNA from hair roots was below the sensitivity of the assay (< 0.015 ng).

The studied population sample was divided into two groups: red-haired individuals and individuals with non-red hair colour. Those included in the group of redheads were characterized by different shades of hair colour, but for practical reasons, they were divided into two (sub)groups: individuals with red hair and individuals with reddish blond hair. The group of individuals with non-red hair colour was divided into four (sub)groups: individuals with blond, dark blond, brown and dark hair. All but two subjects were unrelated men and women from northern Poland, mainly from Pomerania. Data on pigmentation characteristics are shown in Table III. The most common phenotype in

the group of individuals with non-red hair colour was: brown hair and blue eyes. The frequency distribution of the various hair colours in our population sample was roughly consistent with the data for the whole of Poland (9% fair, 35% dark blond, 2–4% red, approx. 50% brown and black, although the latter group were less numerous) [9]. The population sample was over-represented by people with red hair, which was the result of a deliberate action designed to improve the chance of occurrence of the rare recessive genotype of MC1R variants. The quantitative dominance of women in the studied sample was associated with both the ease of collecting material in the form of hair, because women's hair is longer (often thicker) and with the fact that women are more willing to donate biological material for research. Table IV shows the frequency of occurrence of the variants observed in the analyzed population sample. Among the 11 variable positions of the MC1R gene, only two alleles were observed at each of the polymorphic sites.

The results show that variation in the MC1R gene in the analyzed population sample is close to the variation level observed in the south Polish population and other north European populations [14].

Three of the 11 variable positions: N29insA, D294H and Y152OCH (variants strongly predisposing to reddish hair colour) were non-polymorphic in the population sample, which is associated with a very low incidence of these variants in Poland (in the southern Polish population from 1.3–2.5%) and the relative-

ly small number of red-haired persons tested in this study ( $N = 18$ ).

The most common polymorphic changes in the group of redheads were R151C and R160W, with an incidence of about 28%. In the red-haired people from the northern Polish population, in contrast to the southern Polish population [5], a relatively large number (about 13%) of heterozygous R/wild type and recessive homozygous r/R were observed. One of the possible explanations could be the small number of red haired persons studied. We can also speculate on the effects of other factors such as sexual selection, natural selection and historical factors.

### 3.2. Genotype – phenotype associations

#### 3.2.1. Penetration

Penetration means the frequency of occurrence of a feature conditioned by a given gene in the phenotype of the individual. The percentage of people with a specific genotype who had red hair (penetration of red hair) is given in Table V.

In order to determine the correlation between recessive variants of the studied SNP position and a particular colour of hair, eyes and skin type, an appropriate statistical analysis was used. The  $\chi^2$  test confirmed a strong correlation between R151C and R160W variants and red hair colour in the northern Polish popula-

tion ( $p < 0.001$ ). This relationship was also observed in the southern Polish population [14]. Tests on the functional consequences of these variants of the MC1R gene suggest that these mutations are responsible for reducing expression of the receptor in the membrane of melanocytes [1]. The present study confirmed that the R151C and R160W variants also appeared in red-haired people in combination with other variants of other polymorphisms, and ultimately 17 out of 18 red-haired individuals had at least one of these changes.

The R142H variant is likely to be highly correlated with dark red hair colour (this variant appeared only in individuals with this hair colour, but in our population sample it occurred so rarely that it was impossible to obtain the odds ratio (*OR*) value). The R142H variant was not observed in people with reddish blond hair colour. Analysis of *OR* values suggests that the presence of a recessive variant R151C results in a very high probability that an individual possesses reddish hair colour (reddish or reddish blond), and the likelihood that it will be a dark red colour is greater. However, having a single variant of R160W entails a significant probability of having red hair colour or – more likely – reddish blond colour.

In the northern Polish population, as in the southern Polish population, the association of variant R142H with reddish hair colour was not considered statistically significant due to the low frequency.

TABLE III. CHARACTERISTICS OF STUDIED INDIVIDUALS

Feature	Number ( $n = 95$ )
Sex	
Women	76
Men	19
Hair colour	
Red	12
Reddish blond	6
Blond	11
Dark blond	29
Brown	32
Black	5
Eye colour	
Blue/gray	57
Green	10
Hazel	17
Brown	11
Skin type	
I	19
II	32
III	26
IV	18

TABLE IV. MELANOCORTIN 1 RECEPTOR (MC1R) ALLELE FREQUENCIES IN 18 RED-HAIRED INDIVIDUALS AND IN THE GROUP OF 77 CONTROLS

The nucleotide change	The amino-acid change	Redhead $n = 36$ Allele [%]	Control group $n = 154$ Allele [%]
Consensus		13.87	71.91
86insA	N29insA	0	0
C252A	D84E	2.78	0
C451T	R151C	27.78	1.28
G425A	R142H	11.11	0
C478T	R160W	27.78	7.05
G880C	D294H	0	0
C456A	Y152OCH	0	0
G178T	V60L	2.78	2.56
G488A	R163Q	5.56	3.2
G274A	V92M	5.56	14
T464C	I155T	2.78	0

TABLE V. PROPORTION OF RED HAIR IN A GENOTYPED POPULATION SAMPLE. CELLS INDICATE RED HAIR / WHOLE NUMBER OF VARIANT CARRIERS

	N29insA	D84E	R151C	R142H	R160W	D294H	Y152OCH	V60L	R163Q	V92M	I155T	Consensus
N29insA	0/0											
D84E	0/0	0/0										
R151C	0/0	1/1	0/0									
R142H	0/0	0/0	1/1	1/1								
R160W	0/0	1/1	4/4	1/1	0/0							
D294H	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0						
Y152OCH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0					
V60L	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0				
R163Q	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/5	0/1			
V92M	0/0	0/0	0/0	0/0	1/3	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0		
I155T	0/0	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
Consensus	0/0	0/0	2/4	0/0	4/10	0/0	0/0	0/0	0/6	0/11	0/1	1/38

The D84E variant, which is regarded in the literature as strongly associated with reddish hair colour, did not have significant statistical significance in the study sample despite the fact that it occurred only in the group of redheads. The role of this variant in the determination of the RHC phenotype in the northern Polish population is small because of the low frequency of occurrence (small sample population). A similar observation was also made for the population of southern Poland [5].

As already mentioned, the role of variants R151C and R160W, as correlated with reddish hair colour, was the most significant in the studied population. As many as 16 red-haired persons had at least one of these changes. Four of them (one with reddish blond hair) were simple heterozygotes for these variants (one person 151/0 and 3 persons 160/0). This result is consistent with the assumptions that only 10–20% of red-haired people have a combination of one consensus allele and one recessive variant of the MC1R gene [5, 18]. They may probably have a whole range of hair colours from blond through red to black. Similar situations have already been described in the literature [5].

Another factor that was significant for the presence of the phenotype responsible for red hair colour was the phenomenon of complex heterozygosity, which is defined as the presence of two mutant alleles of a given gene, wherein the alleles are different from each other, i.e. caused by different mutations. In this study complex, heterozygotes of the MC1R gene: 151/160, 142/151, 142/160, 151/other, strongly predispose to dark reddish hair colour ( $p < 0.05$ ). Possessing variants 142/160, 151/other, 142/160, 151/160 results in

a great probability of having reddish hair colour ( $OR$  20.6800, 95%  $CI$ , 1.9329–40.8004;  $OR$  15.3333, 95%  $CI$ , 6.2930–42.9203;  $OR$  11.4000, 95%  $CI$ , 2.832–45.8884;  $OR$  2.0481, 95%  $CI$ , 0.4791–8.7548 respectively, Table VI). Variant 151/160 seems to be important in predicting reddish blond hair colour ( $p < 0.001$ ) with an odds ratio equal to 3.4545 (95%  $CI$ , 1.0822–33.3533). The above variants of heterozygous polymorphisms and their combinations results in a high probability of having red hair colour. In this study, one person with reddish blond hair was observed who had two consensus alleles. This phenomenon was also observed occasionally in other tested populations (including the southern Polish population), and can be explained by changes in the regulatory regions, which can reduce the expression of such an allele. It can also occur due to changes in other genes involved in the process of pigmentation, such as the proopiomelanocortin gene, a precursor of-MSH or AGOUTI signalling proteins [11, 13]. Determining two consensus alleles on the MC1R gene in an (individual) sample does not have predictive value for red hair colour.

The  $\chi^2$  test also confirmed the correlation of the G274A variant with blond hair colour, which seems likely and is also observed in the southern Polish population [5].

The subjectivity of the assessment of hair colour was the most problematic factor in this study. It was caused by a lack of uniform terminology and universal meaning of certain terms [18, 19]. We sought to solve this problem by comparing the material available to pre-selected images of different hair colours archetypes.

### 3.2.2. Epistasis

Genetic background may also influence the final effect of the MC1R gene. Previous studies have shown an intermediate masking effect of other genes on the MC1R gene, seen in homozygous non-red-haired individuals with well-known variants of the alleles associated with reddish hair colour [18]. This phenomenon, although observed in some populations (especially with darker pigmentation) occurred neither in the population of northern Poland nor in the southern Polish population. However, it should be seen as significant in predicting phenotype based on genetic testing. This problem can be solved by testing polymorphic sites of other genes involved in pigmentation.

The effect of other genes on phenotype was also observed, but to a lesser extent, during the study described in this work. In several cases, phenotypic differences in pigmentation between persons with the same MC1R genotype were noted. As mentioned above, two of the four heterozygous variants of R151C/consensus and 4 of 10 R160W/consensus were associated with having red hair, but among these people, four had red

hair and two reddish blond hair. Two persons with this genotype had dark hair.

One can speculate that the differences in shades of hair colour may be dependent on the type of heterozygosity (heterozygote/complex heterozygote) and may be associated with the total characteristic melanin content, which is also affected by other genes involved in pigmentation. The results and data in the literature consistently show that the shade of reddish hair colour is not possible to genetically predict [5].

### 3.2.3. Pleiotropic effects

MC1R is widely regarded as a pleiotropic gene; an example of this is the fact that most red-haired people are also characterized by pale skin (often with freckles) and light (blue or green) eye colour. For this reason, the presence of recessive variants of MC1R strongly associated with red hair, such as R151C or R160W, can be considered as clearly indicating not only red or reddish blond hair colour, but most likely also pale skin with freckles and light eye colour (Table VII).

TABLE VI. THE VALUES OF THE ODDS RATIO FOR SUBJECTS WITH HETEROZYGOUS COMBINATIONS OF ALLELES AND THEIR IMPACT ON VARIOUS HAIR COLOURS,  $p < 0.05$ .

Hair colour	151/160	142/151	142/160	151/cons	160/cons	142/cons
Red	<b>2.0481</b>	<b>11.4000</b>	<b>20.6800</b>	<b>25.3333</b>	7.4545	<b>4.4706</b>
Reddish blond	<b>3.4545</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Red	<b>10.0000</b>	<b>11.4000</b>	<b>20.6800</b>	<b>25.3333</b>	7.4545	<b>4.4706</b>
Blond	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Dark blond	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Brown	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	2.1000	2.1000
Black	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Bolded figures are statistically significant.

TABLE VII. THE VALUE OF THE ODDS RATIO FOR EACH RECESSIVE VARIANT POLYMORPHISM AND ITS IMPACT ON THE VARIOUS HAIR COLOURS,  $p < 0.05$

Colour of hair	D84E	R142H	R151C	R160W	R163Q	V92M	V60L	I155T
Red	0.0000	0.0000	<b>5.4286</b>	<b>2.2521</b>	2.8889	0.8758	2.0000	0.0000
Reddish blond	0.0000	0.0000	<b>2.8982</b>	<b>8.4706</b>	0.0000	0.7889	0.0000	0.0000
Red	0.0000	0.0000	<b>24.6667</b>	<b>5.4167</b>	1.4792	0.7625	1.0735	0.0000
Blond	0.0000	0.0000	0.0000	0.3611	0.0000	<b>0.4136</b>	0.0000	0.0000
Dark blond	0.0000	0.0000	0.7733	0.4902	1.4880	0.8230	1.6410	0.0000
Brown	0.0000	0.0000	0.0000	0.6125	1.3333	1.3442	1.4762	0.0000
Black	0.0000	0.0000	0.0000	2.4912	0.0000	2.8627	0.0000	0.0000

Bolded figures are statistically significant.

Those with a single allele (variant of allele) and second consensus allele are often not redheaded. However, the effect of a single mutation decreasing the function of the melanocortin I receptor may still have an impact on the physical characteristics of individuals. Among the non-redheaded people we found two men who were simple heterozygous for the study alleles and did not have red hair, but had a red beard.

It is certainly not possible to speculate about the colour of the eyes based on an analysis of the MC1R gene [5], despite the fact that there was a weak statistically significant correlation between green eyes and the presence of a recessive variant R160W ( $p < 0.05$ ). Some data in the literature suggested a relationship between recessive variants of the MC1R gene and blue eye colour [7, 13]. In the present study, the combination of heterozygous 151/other allele seems poorly correlated with the blue colour of eyes ( $p < 0.05$ ). The explanation for the bias of some correlations may be the specific nature of subpopulations or the way of selecting the research sample.

A similar phenomenon is also observed in the case of correlation of the skin type with recessive variants of the tested gene. The presence of variants: R142H, R151C and R160W is strongly correlated with the possession of type I skin on the Fitzpatrick Scale ( $p < 0.05$ ). This phenomenon can be explained by the fact that, by definition, the RHC phenotype is associated with a tendency for the skin (type I) to burn, and the above-mentioned recessive variants were strongly correlated with this phenotype. The case is similar for variant V92M, which in the study of the northern Polish population was correlated with blond hair. People with blond hair are often characterized by skin type II, and this type of correlation was also observed. A statistically significant correlation was also observed between complex heterozygote 151/cons and skin type.

#### 4. Summary

Our studies on the northern Polish population sample showed a relatively high frequency of variants R151C and R160W. The association of these variants with reddish hair colour makes the analysis of these specific positions very promising in terms of phenotype prediction of hair colour. The R142H variant also proved to be statistically significant in predicting RHC phenotype despite its low frequency. Three major variants affecting the efficiency of the melanocortin I receptor: N29insA, D294H and Y152OCH were not present in the population, but because of its significant

impact on the colour of hair, this analysis still appears to be valuable.

Recessive homozygotes for the above polymorphisms or complex heterozygotes have a high probability of having red or reddish blond hair and fair skin (type I). These studies have also shown that the presence of two consensus alleles of the MC1R gene in a sample does not rule out red hair colour in the given person, but the probability of it is very low.

#### References

1. 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.
2. Beaumont K. A., Sheker S. N., Newton R. A. [et al.], Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlation for MC1R variant alleles, *Human Molecular Genetics* 2005, 14, 2145–2154.
3. Branicki W., Studies on predicting pigmentation phenotype for forensic purposes, *Problems of Forensic Sciences* 2009, 77, 29–52.
4. Branicki W., Brudnik U., Wojas-Palec A., Genetic prediction of pigmentary traits in forensic studies, *Problems of Forensic Sciences* 2005, 44, 343–357.
5. 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.
6. Branicki W., Brudnik U., Wojas-Palec A., [et al.] Forensic application of a rapid test for red hair colour prediction and sex determination, *Problems of Forensic Sciences* 2007, 49, 37–51.
7. 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.
8. Garcia-Robron J. C., Sanchez-Leorend B., Jimenez-Cervantez C., Melanocortin-1 receptor, structure and functional regulation, *Pigment Cell Research* 2005, 18, 393–410.
9. [http://www.lorealparis.pl/\\_pl/\\_pl/home/index.aspx](http://www.lorealparis.pl/_pl/_pl/home/index.aspx).
10. Jobling M. A., Pandya A., Tyler-Smith C., The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing, *International Journal of Legal Medicine* 1997, 110, 118–124.
11. Kanetsky P. A., Rebback 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.
12. 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.



13. Koppula S. V., Robbins L. S., Lu D., [et al.], Identification of common polymorphisms in the coding sequence of the human MSH receptor (MC1R) with possible biological effects, *Human Mutation* 1997, 9, 30–36.
14. 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.
15. Landergren U., Kaiser R., Sanders J. [et al.], A ligase-mediated gene detection technique, *Science* 1988, 241, 1077–1080.
16. 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.
17. Ogle Jr. R. R., Fox M. J., Atlas of human hair microscopic characteristics, CRC Press, Boca Raton 1999.
18. Pastorino L., Cusano R., Bruno W. [et al.], Novel MC1R variants in Ligurian melanoma patients and controls, *Human Mutation* 2004, 24–103.
19. Rees J. L., Genetics of hair and skin color, *The Annual Review of Genetics* 2003, 37, 67–90.
20. Rees J. L., Flanagan N., Pigmentation, melanocortins and red hair, Editorial 1999, *Quarterly Journal of Medicine* 1999, 92, 125–131.
21. 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.

---

**Corresponding author**

Patrycja Kulwikowska  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Zakład Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego  
ul. Do Studzienki 38  
PL 80-227 Gdańsk  
e-mail: zppg@gumed.edu.pl

---

## BADANIE POLIMORFIZMU POJEDYNCZEGO NUKLEOTYDU W GENIE RECEPTORA MELANOKORTYNY I

### 1. Wstęp

Określenie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem jest przedmiotem bardzo intensywnych badań naukowych dokonywanych nie tylko przez specjalistów z dziedziny genetyki sądowej.

Profil genetyczny sprawcy przestępstwa otrzymany na podstawie analizy śladów biologicznych może być źródłem cennych informacji o cechach fizycznych tej osoby. Ten rodzaj informacji byłby szczególnie istotny w sytuacji braku podejrzanego lub sprzecznych zeznań świadków dotyczących opisu wyglądu sprawcy. Kolor oczu i włosów oraz typ skóry to cechy łatwo rozpoznawalne i charakterystyczne dla danej osoby, a zatem ich predykcja wydaje się wartościowa w przypadku medycyny sądowej.

Pigmentacja jako cecha ilościowa jest trudna do analizy, gdyż sugeruje się, że w jej determinację zaangażowanych jest ponad 120 genów [3, 4, 16], z których na chwilę obecną tylko kilkanaście uznano jako mające wpływ na ilość melaniny w organizmie człowieka. Najlepiej przebadanym genem odpowiedzialnym za pigmentację jest gen MC1R (16q24.3) o długości 951 pz, kodujący receptor dla melanokortyny typu I [17, 18, 21]. Receptor ten związany jest z błoną komórkową melanocytów. Jego aktywacja przez hormon melanotropowy alfa MSH i hormon adrenokortykotropowy (ACTH) prowadzi do wzrostu stężenia cAMP, co skutkuje wzrostem syntezy eumelaniny (ciemnego barwnika – czarnego lub brązowego) przy jednoczesnym obniżeniu ilości produkowanej feomelaniny (jasnego barwnika – żółtego lub czerwonego) [3, 15, 19, 21].

Istnieje kilkadziesiąt różnych alleli genu MC1R, z których kilka, opisanych jako zmniejszające funkcjonalność lub wpływające na ekspresję receptora błony melanocytów, wiązanych jest z nadprodukcją feomelaniny, która manifestuje się fenotypem RHC. Osoby o fenotypie RHC charakteryzują się rudym kolorem włosów, jasną skórą, która pod wpływem promieni UV łatwo doznaje poparzeń słonecznych (I typ skóry wg Fitzpatricka) i obecnością piegów [8, 10, 11, 19].

Allele genu MC1R podzielono na dwie grupy: silnie predysponujące do fenotypu RHC oznaczone jako R oraz o niższym stopniu korelacji z tym fenotypem – r [3, 6, 8, 9, 10]. Pierwotnie do pierwszej grupy zaliczały się cztery pozycje typu SNP: C252A, C451T, C478T, G880C, później rozszerzono ją o G425A oraz mutacje typu missense-89insA. Do kategorii r zalicza się pozycje: G178T, G274A, G488A oraz T464C.

Badania funkcjonalne potwierdziły, że mutacje w G425A, C451T, C478T, G880C istotnie prowadzą do obniżenia efektywności działania receptora [2, 3], jednak mechanizm działania tych mutacji nie jest w pełni zrozumiały i może się różnić w zależności od badanego polimorfizmu.

Fenotyp RHC dziedziczony jest w sposób przypominający dziedziczenie recesywne, lecz efekt mutacji jest ilościowy, co znaczy, że osobniki heterozygotyczne posiadające jeden zmutowany allel i jeden normalny mogą mieć jaśniejszą skórę, rudawy odcień włosów lub piegi; dodatkowo u mężczyzn ten układ alleli może manifestować swoją obecność rudawym kolorem zarostu. Homozygoty posiadające dwa zmutowane allele R lub heterozygoty złożone R/R przeważnie posiadają fenotyp RHC. Najliczniej w populacji występują zmiany C451T oraz C478T i właśnie te dwa miejsca polimorficzne mają największy wpływ na występowanie fenotypu RHC w populacjach Europy północnej. Jednak w populacji włoskiej zaobserwowano przypadki, w których homozygoty posiadające dwa zmutowane allele R nie posiadały fenotypu RHC [11], co prawdopodobnie wiąże się z maskującym wpływem innych genów.

Celem niniejszej pracy było określenie częstości występowania poszczególnych polimorfizmów genu MC1R odpowiedzialnych za rudy kolor włosów w próbie populacji Polski północnej i przydatności ich badania w celu określenia rudego koloru włosów.

### 2. Materiały i metody

#### 2.1. Próbkki

W celu przeprowadzenia badań populacyjnych zebrano materiał w postaci włosów i wymazów ze słuzówki jamy ustnej od 100 osób zamieszkujących Polskę północną. Osoby dobrano tak, aby reprezentowani byli mężczyźni i kobiety o wszystkich możliwych kolorach włosów występujących w badanej populacji.

Oceny koloru włosów dokonano metodą makroskopową i mikroskopową, przyporządkowując je do sześciu kategorii kolorystycznych (włosy rude, rudoblond, blond, ciemnoblond, brązowe i czarne) na podstawie archetypów kolorów zamieszczonych w „Atlasie włosów” [17].

Oceny koloru oczu i skóry dokonano podczas pobierania próbek. W przypadku stosowania zabiegów fryzjerskich, które mogły prowadzić do zmiany koloru włosów, odstępowano od ich pobrania. Kolor oczu określano jako niebieski, zielony, piwny lub brązowy. Typ skóry oce-

niano według skali Fitzpatricka określającej wrażliwość skóry na działanie promieni słonecznych:

- typ I – skóra łatwo ulegająca poparzeniom, która nigdy się nie opala. Na promienie słoneczne reaguje zazwyczaj rumieniem;
- typ II – skóra łatwo ulega poparzeniu i trudno się opala. Na początku reaguje na słońce rumieniem i zaczerwienieniem, następnie stopniowo postępuje pigmentacja skóry. Nie jest to duży stopień opalenia, aczkolwiek widoczny;
- typ III – skóra, która jest stosunkowo oporna na oparzenia, łatwo też ulega pigmentacji. Na pierwsze słońce reaguje niewielkim rumieniem, który szybko ustępuje miejsca znacznej i widocznej opaleniznie;
- typ IV – skóra nigdy nie ulega poparzeniom i zawsze dobrze się opala. Na pierwsze promienie słoneczne reaguje silną pigmentacją bez rumienia.

Z cebulek włosowych, jak i z wymazów ze śluzówki jamy ustnej, izolowano DNA z zastosowaniem metody organicznej fenol/chloroform.

## 2.2. Izolacja DNA

### 2.2.1. Izolacja z cebulek włosów

Do fragmentów włosów z cebulkami dodano 300  $\mu$ l buforu TNCa (10 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2% SDS, 39 mM DTT, 0,025% proteinaza K), 15  $\mu$ l proteiny K (2 mg/ml) oraz 10  $\mu$ l DTT 1 M. Całość worteksowano i inkubowano 24 h w 56°C. Próbkę worteksowano i wirowano przez 10 min przy 13 000 rpm. 400  $\mu$ l supernatantu dodano do 2 ml sterylnych probówek zawierających 400  $\mu$ l mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy. Całość worteksowano 3 min, po czym wirowano 30 min przy 13 000 rpm. Następnie 400  $\mu$ l supernatantu dodawano do 2 ml sterylnych probówek zawierających 750  $\mu$ l 99,9% alkoholu i 30  $\mu$ l 3 M octanu sodu. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze –20°C przez noc lub kilka dni w celu precypitacji DNA. Ekstrakty po precypitacji wirowano przez 25 min przy 13 000 rpm. Odrzucano supernatant, zaś osad po wysuszeniu w temperaturze pokojowej zawieszano w 16  $\mu$ l Tris-HCl pH 8,5.

### 2.2.2. Izolacja z nabłonków jamy ustnej

Wacik z wymazem umieszczano w probówce, do której uprzednio dodano 370  $\mu$ l buforu TE pH 8, 20  $\mu$ l proteiny K (2 mg/ml) oraz 13  $\mu$ l SDS 20%. Całość worteksowano i inkubowano 24 h w temperaturze 56°C. Próbkę worteksowano i wirowano 10 min przy 13 000 rpm. 400  $\mu$ l supernatantu dodano do 2 ml sterylnych probówek zawierających 400  $\mu$ l mieszaniny fenol:chloroform:alkohol izoamyłowy. Całość worteksowano 3 min, po czym wirowano 30 min przy 13 000 rpm. Następnie 400  $\mu$ l supernatantu dodawano do 2 ml sterylnych

probówek zawierających 750  $\mu$ l 99,9% alkoholu i 30  $\mu$ l 3 M octanu sodu. Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze –20°C przez noc lub kilka dni w celu precypitacji DNA. Ekstrakty po precypitacji wirowano przez 25 min przy 13 000 rpm. Odrzucano supernatant, zaś osad po wysuszeniu w temperaturze pokojowej zawieszano w 16  $\mu$ l Tris-HCl pH 8,5.

## 2.3. Pomiar stężenia

Pomiaru stężenia DNA dokonywano metodą fluorometryczną z zastosowaniem odczynnika PicoGreen (Molecular Probes) oraz fluorymetru Ascant FL.

## 2.4. Analiza sekwencji genu MC1R

### 2.4.1. Amplifikacja metodą multiplex PCR

DNA amplifikowano z zastosowaniem starterów komplementarnych do sekwencji genu MC1R i genu amelogeny w reakcji multiplex PCR. Informacje dotyczące starterów zamieszczono w tabeli I. Mieszanina reakcyjna składała się z: 5  $\mu$ l QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, 0,5  $\mu$ l mieszaniny starterów (tabela III), 2,5  $\mu$ l wody HPLC oraz 2  $\mu$ l matrycowego DNA o stężeniu od 0,1–3 ng w całkowitej objętości reakcyjnej 10  $\mu$ l. Reakcję prowadzono, stosując następujący profil temperatury: 94°C/15 min (94°C/0, 30 min, 63°C/1,30 min, 72°C/1,30 min) 34  $\times$ , 72°C/10 min, 4°C/ $\infty$ .

Produkty reakcji oczyszczono, używając zestawu ExoSap IT kit (Amersham Pharmacia, Freiburg, Niemcy).

### 2.4.2. Reakcje minisekwencjonowania

Genotypowanie badanych pozycji typu SNP prowadzono z zastosowaniem dwóch reakcji typu multiplex z użyciem zestawu SNaPshot Multiplex Kit (ABI PRISM) w dwóch reakcjach multiplexowych, stosując się do zaleceń producenta. Informacje dotyczące starterów zamieszczono w tabeli II.

Reakcja multiplex 1 przebiegała w 5  $\mu$ l mieszaniny zawierającej 2,5  $\mu$ l SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1,2  $\mu$ l mieszaniny starterów, 0,4  $\mu$ l wody HPLC oraz 0,9  $\mu$ l oczyszczonego produktu amplifikacji DNA. Reakcja multiplex 2 przebiegała w 5  $\mu$ l mieszaniny zawierającej: 2,5  $\mu$ l SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix, 1,3  $\mu$ l mieszaniny starterów, 0,3  $\mu$ l wody HPLC oraz 0,9  $\mu$ l oczyszczonego produktu amplifikacji DNA.

W każdym eksperymencie przeprowadzono także kontrolę pozytywną i negatywną reakcji. Produkty reakcji minisekwencjonowania oczyszczono z zastosowaniem alkalicznej fosfatazy z cielęcych jelit (CIP, New England BioLabs), stosując się do zaleceń producenta.

## 2.5. Elektroforeza kapilarna

Produkty reakcji minisekwencjonowania rozdzielano za pomocą elektroforezy kapilarnej na automatycznym sekwenatorze ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Mieszanka reakcyjna zawierała: 12 µl formamidu, 0,2 µl wewnętrznego standardu wielkości GeneScan-120 LIZ i produkt reakcji minisekwencjonowania. Elektroforezę przeprowadzano w warunkach zgodnych z zaleceniami producenta zestawu SNaPshot Multiplex Kit (ABI PRISM).

### 2.4.4. Analizy statystyczne

Analiz statystycznych dokonano z zastosowaniem programu Statistica Data Miner + QC i programu Logistic Regression Version 05.07.20. Statystyczną ocenę analizowanych danych przeprowadzono z zastosowaniem testu  $\chi^2$  oraz regresji logistycznej.

## 3. Wyniki i dyskusja

### 3.1. Dane populacyjne

Badaniom poddano 100 osób z populacji Polski północnej. Pełny profil uzyskano dla 95 badanych osób. U pozostałych 5 osób ilość wyizolowanego DNA z cebulki włosa była poniżej progu czułości metody ( $< 0,015$  ng). Badaną próbę populacyjną podzielono na dwie grupy: osobników rudowłosych i osobników o innych niż rudy kolorach włosów. Osoby włączone do grupy rudowłosych charakteryzowały się różnymi odcieniami tego koloru włosów, ale ze względów praktycznych podzielono je na dwie podgrupy: osobników o włosach rudych i osobników o włosach rudoblond. Grupę osobników o innym niż rudy kolor włosów podzielono na cztery podgrupy: osobników o włosach blond, osobników o włosach ciemnoblond, osobników o włosach brązowych oraz osobników o włosach czarnych. Wszyscy z wyjątkiem dwóch badanych byli niespokrewnionymi mężczyznami i kobietami z północnej Polski, głównie z województwa pomorskiego. Dane dotyczące cech pigmentacji przedstawiono w tabeli III. Najczęstsze cechy fenotypowe u osób z grupy osobników o innym niż rudy kolorze włosów to brązowe włosy i niebieskie oczy. Rozkład częstości poszczególnych kolorów włosów w badanej próbie populacyjnej był w przybliżeniu zgodny z danymi dotyczącymi tej cechy w całej Polsce (9% blond, 35% ciemnoblond, 2–4% rudy, ok. 50% brązowy i czarny, przy czym ta ostatnia grupa była mniej liczna) [9]. Badana próba populacyjna była nadreprezentowana przez osoby o rudym kolorze włosów, co wynikało z celowego działania mającego zwiększyć szansę na wystąpienie rzadkich wariantów recesywnych genotypów MC1R. Ilościowa do-

minacja kobiet w badanej próbie związana była zarówno z faktem łatwiejszego pobierania materiału w postaci włosów, gdyż są one dłuższe (często również grubsze), jak i z faktem, że kobiety chętniej oddawały materiał biologiczny do badań. Tabela IV przedstawia częstości występowania poszczególnych wariantów badanych polimorfizmów. Wśród 11 zmiennych pozycji genu MC1R badania wykazały tylko dwa allele w każdym z badanych miejsc polimorficznych.

Uzyskane wyniki pokazują, że zmienność genu MC1R w badanej próbie populacyjnej jest zbliżona do poziomu zmienności charakterystycznej dla populacji Polski południowej oraz innych populacji pochodzenia północnoeuropejskiego [14].

Trzy spośród 11 zmiennych pozycji: N29insA, D294H, Y152OCH (należące do wariantów silnie predysponujących do rudego koloru włosów) okazały się niepolimorficzne w badanej populacji, co ma związek z bardzo małą częstością występowania tych wariantów w Polsce (w populacji Polski południowej od 1,3–2,5%) i stosunkowo niewielką liczbą przebadanych osób rudowłosych w niniejszym badaniu ( $N = 18$ ).

Najczęściej występującymi zmianami polimorficznymi w grupie osób rudowłosych były R151C i R160W z częstością występowania ok. 28%. Wśród osób rudowłosych w populacji Polski północnej stosunkowo dużo (ok. 13%) jest heterozygot R/*wild type* a mało homozygot recesywnych R/R, licznych w populacji Polski południowej [5]. Przyczyny tego zjawiska upatrywać można w niewielkiej liczbie przebadanych rudowłosych osób. Spekulować można również nad wpływem czynników takich, jak dobór płciowy, selekcja naturalna czy czynniki historyczne.

### 3.2. Asocjacje genotyp – fenotyp

#### 3.2.1. Penetracja

Przez penetrację rozumiemy częstość pojawiania się cechy warunkowanej przez dany gen w fenotypie osobnika. Odsetek osób o określonym genotypie, które posiadały rude włosy (penetracja rudych włosów), podany jest w tabeli V.

W celu określenia korelacji pomiędzy recesywnymi wariantami badanych pozycji SNP a konkretnym kolorem włosów, oczu i typem skóry, zastosowano odpowiednie obliczenia statystyczne. Testem  $\chi^2$  potwierdzono silną korelację wariantów R151C i R160W z rudym kolorem włosów w populacji Polski północnej ( $p < 0,001$ ). Zależność tę dostrzeżono wcześniej również dla populacji Polski południowej [14]. Badania na temat funkcjonalnych konsekwencji tych wariantów genu MC1R sugerują, że mutacje te odpowiedzialne są za zmniejszenie ekspresji receptora w błonie melanocytów [1]. Niniejsze badanie potwierdziło, że warianty R151C i R160W po-

jawiały się u rudowłosych osób również w połączeniu z innymi wariantami pozostałych polimorfizmów i ostatecznie 17 z 18 rudowłosych osobników miało chociaż jedną z tych zmian.

Wariant R142H prawdopodobnie jest silnie skorelowany z ciemnorudym kolorem włosów (występował on tylko u osób o tym kolorze włosów, jednak w badanej próbie był na tyle rzadki, że nie udało się uzyskać dla niego wartości *OR*), natomiast nie pojawiał się w badanej próbie u osób rudoblonde. Wartości ilorazu szans (*OR*) sugerują, że obecność recesywnego wariantu R151C skutkuje bardzo dużym prawdopodobieństwem posiadania przez tego osobnika rudego koloru włosów (rudego lub rudoblonde), przy czym prawdopodobieństwo, że będzie to kolor ciemnorudy, jest większe. Natomiast posiadanie jednego wariantu R160W niesie za sobą istotne prawdopodobieństwo posiadania rudego koloru włosów lub – co bardziej prawdopodobne – koloru rudoblonde.

W populacji Polski północnej, podobnie jak w Polsce południowej, asocjacja wariantu R142H z rudym kolorem włosów nie została uznana za istotną statystycznie z powodu mniejszej częstości występowania.

Wariant D84E, uznawany w literaturze przedmiotu jako silnie powiązany z rudym kolorem włosów, nie miał w badanej próbie istotnego znaczenia statystycznego pomimo faktu, iż występował on tylko u przedstawicieli grupy osób rudowłosych. Rola tego wariantu w determinacji fenotypu RHC w populacji Polski północnej jest mała z powodu niskiej częstotliwości występowania (mała próba populacyjna). Analogiczne obserwacje poczyniono również dla populacji południowej Polski [5].

Jak już wspomniano, najbardziej znacząca w badanej populacji była rola wariantów R151C i R160W jako korelujących z rudym kolorem włosów. Aż u 16 badanych rudowłosych osób wystąpiła przynajmniej jedna z tych zmian. Cztery z nich (jedna o rudoblonde włosach) posiadały proste heterozygoty (jedna osoba 151/0 i 3 osoby 160/0). Wynik ten jest zgodny z przypuszczeniami, że tylko u 10–20% rudych osób występuje połączenie jednego allela consensusowego i jednego wariantu recesywnego w genie *MC1R* [5, 18]. Osoby takie mogą prawdopodobnie charakteryzować się całą gamą kolorów włosów od blond poprzez rudy aż do czarnych. Podobne sytuacje opisano już w literaturze przedmiotu [5].

Istotne dla obecności fenotypu odpowiedzialnego za rudy kolor włosów okazało się również zjawisko złożonej heterozygotyczności, która rozumiana jest jako obecność dwóch zmutowanych alleli danego genu, przy czym allele te są różne od siebie, tzn. wywołane różnymi mutacjami. W przeprowadzonych badaniach heterozygoty złożone genu *MC1R*: 151/160, 142/151, 142/160, 151/inny silnie predysponują do ciemnorudego koloru włosów ( $p < 0,05$ ). Posiadanie wariantów 142/160 151/inny, 142/160, 151/160 skutkuje dużą szansą posiadania rudego koloru włosów (odpowiednio *OR* 20,6800,

95% *CI*, 1,9329 –40,8004; *OR* 15,3333, 95% *CI*, 6,2930–42,9203; *OR* 11,4000, 95% *CI*, 2,832–45,8884; *OR* 2,0481, 95% *CI*, 0,4791 –8,7548; tabela VI). Wariant 151/160 okazał się również ważny w predykcji włosów rudoblonde ( $p < 0,001$ ) z ilorazem szans równym 3,4545 (95% *CI*, 1,0822–33,3533). Wymienione powyżej warianty polimorfizmów oraz ich heterozygotyczne kombinacje dają duże prawdopodobieństwo posiadania przez badane osoby rudego koloru włosów. W niniejszym badaniu zaobserwowano przypadek jednej osoby o rudoblonde włosach, która miała dwa allele consensusowe. Zjawisko to było sporadycznie obserwowane również w innych badanych populacjach (w tym populacji Polski południowej) i może być wyjaśnione zmianami w regionach regulatorowych, które mogą np. zmniejszać ekspresję allela. Może ono również wystąpić z powodu zmian w innych genach zaangażowanych w procesy pigmentacji, jak gen proopiomelanokortyny, prekursor-MSH lub białka sygnalizującego AGUTI [11, 13]. Oznaczenie dwóch consensusowych alleli w genie *MC1R* w próbce nie ma wartości predykcyjnej dla rudego koloru włosów.

Test  $\chi^2$  potwierdził również korelację wariantu G274A z włosami koloru blond, co wydaje się prawdopodobne i obserwowane jest m.in. w populacji Polski południowej [5].

Subiektywny aspekt oceny koloru włosów był najbardziej problematycznym czynnikiem w niniejszym badaniu. Spowodował go brak jednorodnej terminologii oraz uniwersalnego znaczenia niektórych terminów [18, 19]. Problem ten starano się rozwiązać przez porównanie dostępnego materiału do wybranych wcześniej fotografii archetypów poszczególnych kolorów włosów.

### 3.2.2. Epistaza

Tło genetyczne może również wpływać na ostateczny efekt działania genu *MC1R*. Badania wykazały pośredni maskujący wpływ innych genów na *MC1R*, widoczny u homozygotycznych nierudych osobników z dobrze znanymi wariantami alleli związanymi z rudym kolorem włosów [18]. Zjawisko to, choć obserwowane w niektórych populacjach (szczególnie o ciemniejszej pigmentacji), nie wystąpiło ani w badanej populacji Polski północnej, ani we wcześniejszych badaniach populacji Polski południowej. Jednak należy je rozpatrywać jako znaczące dla przewidywania fenotypu na podstawie testów genetycznych. Problem ten rozwiązać może badanie polimorficznych miejsc innych genów odpowiedzialnych za pigmentację.

Wpływ innych genów na cechy fenotypowe obserwowany był także, jednak w mniejszym stopniu, podczas badań opisanych w niniejszej pracy. Zauważono w kilku przypadkach różnice między cechami fenotypowymi dotyczącymi pigmentacji u osób z tym samym genotypem *MC1R*. Jak wspomniano wyżej, 2 z 4 heterozygotycznych wariantów R151C/consensus i 4 z 10 R160W/consensus

związany był z posiadaniem rudych włosów, ale spośród tych osób cztery posiadały włosy rude, a dwie rudoblonde. Dwie osoby z tym genotypem miały włosy ciemne.

Można spekulować, że różnice w odcieniach koloru włosów mogą być zależne od rodzaju heterozygotyczności (heterozygota/złożona heterozygota) i wiązać się z całkowitą charakterystyczną zawartością melaniny, na którą wpływ mają również inne geny pigmentacji. Uzyskane wyniki i dane zawarte w literaturze przedmiotu zgodnie pokazują, że odcień rudego koloru włosów nie jest możliwy do prognozowania genetycznego [5].

### 3.2.3. Efekt plejotropowy

MC1R powszechnie uważa się za gen plejotropowy; przykładem tego jest fakt, że większość rudowłosych osób charakteryzuje się również bladą skórą (często z piegami) i jasnym (niebieskim lub zielonym) kolorem oczu. Z tego powodu obecność recesywnych wariantów MC1R, silnie związanych z rudymi włosami, takich jak R151C lub R160W, można uznać za wyraźnie wskazującą nie tylko na rudą bądź rudoblonde kolor włosów, ale i najprawdopodobniej na bladą skórę z piegami i jasny kolor oczu (tabela VII).

Osoby z jednym allelem (wariantem allelu) i drugim, consensusowym, często nie są rudowłose. Jednak działanie tej pojedynczej mutacji zmniejszającej funkcję receptora melanokortyny I może nadal mieć wpływ na cechy fizyczne osobników. Wśród badanych nierudych mężczyzn znaleziono dwóch, którzy posiadali proste heterozyzy, nie mieli rudych włosów, ale rude brody.

Na pewno nie można spekulować o kolorze oczu w oparciu o analizę MC1R [5] pomimo faktu, że statystycznie istotna okazała się słaba korelacja zielonych oczu i obecności recesywnego wariantu R160W ( $p < 0,05$ ). Niektóre dane zawarte w literaturze przedmiotu stwierdzają związek recesywnych wariantów genu MC1R z niebieskim kolorem oczu [7, 13]. W niniejszym badaniu heterozygotyczna kombinacja 151/inny wydaje się słabo skorelowana z niebieskim kolorem oczu ( $p < 0,05$ ). Wyjaśnieniem stronniczości niektórych korelacji może być specyfika subpopulacji lub sposób doboru próby badawczej.

Podobne zjawisko obserwowane jest także w przypadku korelacji typu skóry z recesywnymi wariantami badanego genu. Obecność wariantów R142H, R151C, R160W jest silnie skorelowana z posiadaniem I typu skóry wg Fitzpatricka ( $p < 0,05$ ). Zjawisko to tłumaczyć można faktem, iż z definicji fenotyp RHC związany jest ze skłonnością skóry do poparzeń (typ I), a wyżej wymienione recesywne warianty silnie skorelowane są właśnie z tym fenotypem. Podobnie jest w przypadku wariantu V92M, który w badaniu populacji Polski północnej okazał się skorelowany z blond włosami. Osoby o blond włosach często charakteryzują się II typem skóry i taką korelację również zaobserwowano. Istotna statystycz-

nie okazała się również korelacja złożonej heterozygoty 151/cons z I typem skóry.

## 4. Podsumowanie

Badania przeprowadzone na populacji Polski północnej wykazały stosunkowo wysoką częstość wariantów R151C i R160W. Ich związek z rudym kolorem włosów sprawia, że analiza tych konkretnych pozycji jest bardzo obiecująca z punktu widzenia prognozowania fenotypu koloru włosów. Wariant R142H również okazał się istotny statystycznie w predykcji fenotypu RHC pomimo jego małej częstości występowania. Trzy ważne warianty wpływające na wydajność receptora melanokortyny I: N29insA, D294H, Y152OCH nie były obecne w badanej populacji, ale ze względu na ich znaczny wpływ na kolor włosów taka analiza wydaje się wciąż cenna.

Osoby z homozygotami recesywnymi dla wyżej wymienionych polimorfizmów bądź z heterozygotami złożonymi wykazują wysokie prawdopodobieństwo posiadania rudych lub rudoblonde włosów i jasnej skóry (typ I). Niniejsze badania wykazały również, że ustalenie dwóch alleli consensusowych MC1R w próbce nie wyklucza rudego koloru włosów u danej osoby, ale prawdopodobieństwo tego jest bardzo niskie.