

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mateja KRNC

**NAPOVEDOVANJE PIGMENTACIJE LAS IN OČI S
POMOČJO SISTEMA HIRISPLEX V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Mateja KRNC

**NAPOVEDOVANJE PIGMENTACIJE LAS IN OČI S POMOČJO
SISTEMA HIRISPLEX V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**PREDICTION OF HAIR AND EYE COLOUR WITH HIRISPLEX
SYSTEM IN SLOVENIAN POPULATION**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Znanost o živalih. Celotna raziskava je bila opravljena v Nacionalnem forenzičnem laboratoriju Ministrstva za notranje zadeve Republike Slovenije v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za zootehniko je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Gregorja Gorjanc in za somentorico prof. dr. Katjo Drobnič. Delovni mentor je bila dr. Vanja Kastelic.

Recenzent: prof. dr. Jurij POHAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Gregor GORJANC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Katja DROBNIČ

Ministrstvo za notranje zadeve Republike Slovenije, Nacionalni forenzični laboratorij

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Krnc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 575.21:340.6 (043.2)
KG genetika/forenzična genetika/ fenotipizacija/biološke sledi/pigmentacija
AV KRNC, Mateja, dipl. inž. kmet. živ.(VS)
SA GORJANC, Gregor (mentor)/DROBNIČ, Katja (somentorica)
KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI 2015
IN NAPOVEDOVANJE PIGMENTACIJE LAS IN OČI S POMOČJO SISTEMA
HIRISPLEX V SLOVENIJI
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP IX, 35 str., 12 pregl., 9 sl., 3 pril., 31 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Novejše področje forenzičnih genetskih preiskav je forenzična fenotipizacija, ki na podlagi molekularno genetskih analiz biološkega materiala s kaznivega dejanja skuša napovedati vizualne lastnosti posameznika, ki je pustil biološko sled. V pomoč pri odkrivanju osumljenca se uporablajo različni sistemi. Eden od takšnih sistemov je HIrisPlex, ki se uporablja za napoved barve las in oči na osnovi 24 genetskih označevalcev SNP (znotraj 11 genov). Namen tega dela je bil preučiti uporabnost napovedi z HIrisPlex v Sloveniji. V ta namen smo pri 100 nesorodnih prostovoljcih izolirali DNA iz brisov ustnih sluznic in določili genotip za 24 izbranih označevalcev SNP ter subjektivno določili obarvanost las in oči. Barvo las smo razdelili v 4 kategorije: plavolasa, rdeča, rjava in črna. Obarvanost oči smo razdelili v 3 kategorije: modra, vmesna in rjava. Na osnovi določenega genotipa 24 označevalcev SNP smo s sistemom HIrisPlex napovedali obarvanost las in oči ter napovedi primerjali z zbranimi fenotipskimi podatki. Obarvanost las smo pravilno napovedali v 84 % in obarvanost oči v 77 %. Sklepamo, da metoda HIrisPlex omogoča uporabne, vendar ne povsem točne napovedi obarvanosti las in oči v slovenski populaciji.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 575.21:340.6 (043.2)
CX genetics/forensic genetics/ phenotyping/biological traces/ pigmentation
AU KRNC, Mateja
AA GORJANC, Gregor (supervisor)/DROBNIČ, Katja (co-advisor)
PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2015
TI PREDICTION OF HAIR AND EYE COLOUR WITH HIRISPLEX SYSTEM IN SLOVENIAN POPULATION
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO IX, 35 p., 12 tab., 9 fig., 3 ann., 31 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Forensic Phenotyping is the latest field of genetic research which is providing information on external visual characteristics of unknown individual from biological trace on crime scene itself. Different systems can be used to identify the suspect. One of them is HIrisPlex which is based on information of 24 SNP DNA markers (within 11 genes) and is used for hair and eye color prediction. Main purpose of this thesis was to study the usefulness of HIrisPlex system in Slovenia. For research intentions mucous membrane swab of 100 randomly chosen non-related volunteers was collected to determine their genotype at the 24 selected SNP markers. In addition their hair and eye color were evaluated based on subjective judgment. Obtained hair colors were divided in 4 categories: blond, red, brown, and black. Obtained eye colors were divided in 3 categories: blue, intermediate, and brown. The HIrisPlex Eye and Hair Colour DNA Phenotyping Webtool was used to predict hair and eye color of volunteers based on the determined genotype of 24 SNP genetic markers. Predicted hair and eye colors were compared to the collected phenotype information. Prediction accuracies were 84 % for hair color and 77 % for eye color. These results show that HIrisPlex method provides useful but not entirely accurate prediction of hair and eye color in Slovenian population.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PRILOG	VIII
SEZNAM GESEL	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SISTEM HIRISPLEX ZA NAPOVEDOVANJE OBARVANOSTI LAS IN OČI	3
2.1.1 Kategorizacija barve las in oči	6
3 MATERIAL IN METODE	8
3.1 ZBIRANJE VZORCEV IN FENOTIPSKIH PODATKOV	8
3.2 IZOLACIJA DNA IZ BRISOV USTNIH SLUZNIC	9
3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE DNA V VZORCIH	9
3.4 POMNOŽEVANJE DNA	11
3.4.1 Pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	11
3.4.2 Pomnoževanje posameznega nukleotida	14
3.5 KAPILARNA ELEKTROFOREZA	18
3.6 GENOTIPIZACIJA IN NAPOVED OBARVANOSTI LAS IN OČI	19
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1 FREKVENCE ALELOV	21
4.2 USPEŠNOST NAPOVEDI OBARVANOSTI LAS	23
4.3 USPEŠNOST NAPOVEDI OBARVANOSTI OČI	25
5 SKLEPI	30
6 POVZETEK	31
7 VIRI	32
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pogoji PCR v realnem času (Quantifiler kits..., 2005).	10
Preglednica 2: Koncentracije standardne sintetične DNA (Quantifiler kits..., 2005).	11
Preglednica 3: Reakcijska mešanica za 12,23 mikrolitersko reakcijo PCR.	12
Preglednica 4: Pogoji PCR.	12
Preglednica 5: Informacije o 24 označevalcev SNP s pozicijo na kromosomu in pripadajočim genom, začetnim oligonukleotidom in koncentracijo za pomnoževanje DNA z metodo PCR (Walsh in sod., 2014).	13
Preglednica 6: Reakcijska mešanica za 10 mikrolitersko reakcijo pomnoževanja SBE z metodo SNaPshot TM .	14
Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja SBE pri metodi SNaPshot TM .	14
Preglednica 8: Priprava reakcijske mešanice za odstranjevanje začetnih oligonukleotidov in ddNTP-jev po začetnem PCR-ju. Volumni so podani za en vzorec.	15
Preglednica 9: Odstranjevanje začetnih oligonukleotidov in ddNTP-jev po pomnoževanju SBE. Volumni so podani za en vzorec.	15
Preglednica 10: Temperaturni cikel za aktivacijo in deaktivacijo encima SAP.	15
Preglednica 11: Informacije o 24 označevalcev SNP, z osnovnim in alternativnim alelom, začetnimi oligonukleotidi SBE in koncentracijami (Walsh in sod., 2014).	16
Preglednica 12: Frekvence alelov za 24 označevalcev SNP na vzorcih iz Slovenije (SLO) in HapMap (CEU)	22

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz različnih odtenkov plavolase (prva vrsta od zgoraj navzdol), rdeče (druga vrsta od zgoraj navzdol), rjave (tretja vrsta od zgoraj navzdol) in črne (četrta vrsta od zgoraj navzdol) barve las.	6
Slika 2: Prikaz različnih odtenkov modre (prva vrsta od zgoraj navzdol), zelene (druga vrsta od zgoraj navzdol), in rjave (tretja vrsta od zgoraj navzdol) barve oči.	7
Slika 3: Shematski prikaz celotnega postopka analize označevalcev SNP (ABI PRISM SNaPshot TM Multiplex Kit..., 2010).	17
Slika 4: HIrisPlex pripomoček za napovedovanje barve las na osnovi verjetnosti (p vrednost) pojavljanja posameznih barv (Walsh in sod., 2013).	20
Slika 5: Primer dveh posameznikov z rjavimi očmi in črnimi (levo) ter rjavimi (desno) lasmi in pripadajoče vrednosti za posamezno barvo las in oči na osnovi sistema HIrisPlex.	23
Slika 6: Primer dveh posameznikov z rjavimi (levo) in modrimi (desno) očmi in rdečimi (levo) ter plavolasimi (blond) lasmi in pripadajoče verjetnosti za posamezno barvo las in oči na osnovi sistema HIrisPlex.	24
Slika 7: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z modro obarvanimi očmi.	26
Slika 8: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z vmesno obarvanimi očmi.	27
Slika 9: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z rjavo obarvanimi očmi.	28

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 1 do 34.

Priloga A2: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 35 do 68.

Priloga A3: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 69 do 100.

SEZNAM GESEL

SNP	je novi genetski označevalec na določenem mestu v genomu, ki nastane zaradi zamenjave v enem samem nukleotidu z drugim in predstavlja variabilnost v zaporedju DNA, ki vpliva na obarvanost las in oči
Polimorfizem	prisotnost razlik med aleli enega gena v populaciji. S tem nastanejo različni fenotipi. To so tudi različni odseki DNA, ki se pomožijo s PCR.
Fenotip	vidna lastnost posameznika, kot je na primer barva las, oči. Na izražanje fenotipa ne vpliva samo genotip, ampak tudi okolje v katerem se posameznik nahaja.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AB	podjetje Applied Biosystems
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
Exo 1	encim za odstanjevanje začetnih oligonukleotidov in dNTP–jev (angl. E. Coli Exonuclease I)
FAM	fluorescenčnim barvilo 6-karboksifluorescein, ki označuje 5' začetne oligonukleotide; reporter
GWAS	asociacijske študije na celotnem genomu (angl. Genome – wide association study)
MATP	membranski transportni protein (angl. membrane – associated transporter protein)
MGB	je molekula, ki je vezana na 3' koncu sonde (angl. Minor Groove Binder)
NQF	nefluorescenčno barvilo, ki se veže na 3' konec DNA; dušilec
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
POP	tekoči polimer (angl. Performance Optimized Polymer)
ROX	fluorescentno barvilo 6-karboksi-X-rodamin, pasivna referenca
SAP	encim za odstanjevanje začetnih oligonukleotidov in ddNTP–jev (angl. Shrimp Alkaline Phosphatase)
SBE	podaljševanje posamezne baze oziroma nukleotida (angl. single base extension)
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. single nucleotide polymorphism)
STR	kratke tandemske ponovitve (angl. Short Tandem Repeat)
TaqMan	tip kemije za zaznavanje PCR produktov, ki vključuje specifično fluorescentno označeno sondu in začetne oligonukleotide
VIC	fluorescenčnim barvilom, ki se veže na 5' konec

1 UVOD

Trenutne rutinske forenzične genetske analize temeljijo na genetskih označevalcih STR (angl. Short Tandem Repeat), ki ležijo v nekodogenih regijah človeškega genoma in ne nosijo informacije o značilnosti posameznika, od katerega izvirajo. Osumljjenca lahko povežemo s kaznivim dejanjem le na podlagi primerjave, in posledično ujemanja, med njegovim profilom STR in istovrstnim profilom STR biološke sledi s področja kaznivega dejanja. Obstajajo pa kazniva dejanja, ki so jih izvedli storilci, katerih profil STR ni poznan. V teh primerih le na podlagi profila STR biološke sledi ne moremo ugotoviti, od katere osebe ta sled izvira. Povezovanje evidenc DNA med evropskimi državami, poveča nabor poznanih profilov STR, vendar ne reši problema, ko profil storilca ni poznan. Za takšne primere so potrebne dodatne metode, ki bi omogočale napoved fenotipskih značilnosti storilcev na osnovi DNA izolirane iz biološke sledi s področja kaznivega dejanja.

Omenjeno vrzel zapoljuje novejše področje forenzičnih genetskih preiskav, imenovano forenzična fenotipizacija, ki na podlagi molekularno genetskih analiz biološkega materiala s kaznivega dejanja skuša napovedati vizualne lastnosti posameznika, ki je pustil biološko sled. Za potrebe iskanja takšnih posameznikov, predvsem pa za zmanjšanje kroga morebitnih osumljenih je vsekakor koristno poznavanje njihovih najbolj karakterističnih fenotipskih lastnosti, kot so barva las, oči, kože, njihova višina in struktura obraza.

V Nacionalnem forenzičnem laboratoriju za reševanje težjih kriminalističnih preiskav, ko ni zadetka v nobeni evidenci DNA, vpeljujejo nove genetske označevalce, imenovani polimorfizmi posameznih nukleotidov ali SNP (angl. single nucleotide polymorphism), ki so potencialno povezani s fenotipskimi značilnostmi ljudi. Na osnovi polimorfnosti takšnih označevalcev SNP se lahko iz bioloških sledi napovejo nekatere zunanje karakteristike posameznika oziroma njihove fenotipske lastnosti (Kastelic in Drobnič, 2012b).

Poznano je, da so nekatere zunanje ali fenotipske lastnosti, kot so pigmentacija ali barva las, oči in kože, v veliki meri odvisne od genotipa. Sprememba v enem samem nukleotidu namreč lahko spremeni izražanje posameznega gena, ki vpliva na obarvanost. Pri ljudeh poznamo več kot 120 identificiranih genov, ki vplivajo na pigmentacijske razlike v odtenkih las, oči in kože (Branicki in sod., 2008). V tem delu smo izbrali do sedaj najbolj raziskane gene in sicer, gen *OCA2*, gen *MC1R*, gen *HERC2*, gen *SLC45A2*, gen *SLC24A4*, gen *KITLG*, gen *TYRP1*, gen *TYR*, gen *EXOC2*, gen *ASIP/PIGU* in gen *IRF4* (Sulem in sod., 2007; Zaumsegel in sod., 2008; Mengel-From in sod., 2008; Eiberg in sod., 2008; Walsh in sod., 2013 in Walsh in sod., 2014). Ta seznam genov je služil kot osnova za razvoj sistema HIrisPlex, ki se uporablja za napoved barve las in oči ljudi na osnovi polimorfnosti 24 označevalcev SNP v omenjenih enajstih genih. Namen naloge je preveriti natančnost napovedi te metode v Sloveniji.

Cilji naloge:

1. Kategorizacija barve las in oči na podlagi zbranih vzorcev
2. Določitev genotipa za 24 označevalcev SNP
3. Opis in uporaba sistema HIrisPlex za napovedovanje barve las in oči na osnovi genotipa 24 označevalcev SNP
4. Analiza uspešnosti napovedi obarvanosti las in oči

Delovne hipoteze:

1. V slovenski populaciji je prisoten polimorfizem na 24 izbranih označevalcev SNP
2. Sistem HIrisPlex omogoča zanesljivo napovedovanje barve las in oči

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEM HIRISPLEX ZA NAPOVEDOVANJE OBARVANOSTI LAS IN OČI

Leta 2011 so Walsh in sod. izvedli raziskavo s kompletom IrisPlex, ki je bil sprva mišljen za napovedovanje barve oči. Kasneje so razvili sistem HIrisPlex za hkratno napovedovanje barve las in oči. Sistem HIrisPlex temelji na 24 polimorfizmih v enajstih genih, ki so jih prvič raziskovali na področju zunanjih karakteristik v povezavi s pigmentacijskimi obolenji pri ljudeh (albinizem) (Walsh in sod., 2013, Walsh in sod., 2014).

Prvi, ki so zbrali enajst genov, ki bolj specifično vplivajo na pigmentacijske značilnosti in jih uporabili tudi za forenzične preiskave so bili Branicki in sod. (2008), katerim so nato sledili še Valenzuela in sod. (2010). V zgodnjih raziskavah so pigmentacijske motnje preučevali skupaj s primerjalno genetiko. Pri tem so večinoma uporabljali živalski model pigmentacije. V ospredje raziskav so prišli predvsem tisti geni, ki so jih lahko povezali tudi s pigmentacijskimi obolenji pri človeku. Med njimi je najbolj raziskano obolenje okulokutani albinizem tipa 1 in tipa 2 (oculo - oči, cutaneous - koža) (Walsh in sod., 2013).

Eden od genov, ki so jih raziskovali v povezavi z obolenji je gen *OCA2*, ki ima posredno vlogo pri napovedovanju rjave in modre barve oči pri ljudeh. Ta gen kodira 110 kDa velik protein, ki vsebuje 12 transmembranskih regij in je klasificiran kot integralni melanosomni membranski protein. Funkcija gena *OCA2* še ni v celoti raziskana. Do leta 2004 je bilo znanih najmanj 35 nepatogenih alelnih variant tega gena, ki bi naj vplivale na barvo oči (Sturm in Frudakis, 2004).

Poleg gena *OCA2* je Eiberg v danski populaciji našel dva označevalca SNP (rs12913832 in rs1129038) znotraj gena *HERC2*, ki bi naj bila povezana z barvo oči. Funkcija proteina *HERC2* je neznana. Omenjena študija predlaga, da sta ta dva označevalca SNP zelo uporabna za uspešno napoved modre barve oči (Eiberg in sod., 2008). Genetske variacije v genu *HERC2* so bolj povezane z barvo oči, kot v genu *OCA2*. Tudi eden izmed bolj pomembnih označevalcev SNP (rs1800407) je lociran v dvanajstem eksonu gena *OCA2* in je pod vplivom izražanja gena *HERC2*. Celotna regija *HERC2/OCA2* je po dosedanjih raziskavah najbolj informativna za napovedovanje modre in rjave barve oči (Martinez-Cadenas in sod., 2013).

Drugi geni, ki prav tako prispevajo k barvi oči so še: gen *SLC24A4*, gen *SLC45A2* (MATP), gen *TYRP1*, gen *TYR*, gen *ASIP* in gen *IRF4*, čeprav pojasnijo manjši delež variabilnosti. Tekom let smo med vrstami sesalcev identificirali veliko genov, ki vplivajo na količino melanina (Walsh in sod., 2013). Obarvanost oči je namreč odraz oblike melanina, ki se nahaja znotraj melanocitnih celic v zenici. Makromolekula melanina se sintetizira v kompleksnem, biokemičnem procesu melanogenezi, pri kateri sodeluje veliko število različnih genov (Allwood in Harbison, 2013).

Melanin pa ne vpliva samo na obarvost oči, ampak tudi na barvo las in kože. Eden izmed pomembnejših genov, ki vpliva na barvo polti in proizvajanje melanina je gen *MC1R*. Vloga tega gena je bila raziskana s pomočjo povezav z rdečimi lasmi in svetlo poltjo (Walsh, 2013). Prve objave o povezavi med variacijami gena *MC1R* z barvo las in kože pri človeku segajo že v leto 1995 (Valverde in sod., 1995). Označevalci SNP tega gena bi naj vplivali na pigmentacijo las (rdeča barva), pigment kože (svetlejša polt) in prisotnost pegic na UV občutljivost kože. Lociran je na kromosому 16 in kodira 317 aminokislin dolg protein. Gen *MC1R* se izraža v različnih celicah, ki sodelujejo pri pigmentacijskemu sistemu. Sama funkcija gena pa še ni v celoti znana (Rees, 2000).

Še en pomemben gen, ki so ga odkrili s pomočjo primerjalne genetike in vpliva na pigmentacijo pri ljudeh je gen *SLC24A5*. Pri tem gre za nasprotje mutacije zlatega gena zebrike (*Danio rerio*), ki ga lahko povežemo s človeško barvo polti. Poleg gena *SLC24A5* vpliva na pigmentacijo polti tudi gen *KITLG* (Walsh in sod., 2013).

Gena *SLC24A5* in *SLC45A2* sta bila vključena v skupino humanih pigmentacijskih genov šele v letu 2006. Do sedaj sta najbolj raziskana označevalci SNP rs1426654 (gen *SLC24A5*) in označevalci SNP rs16891982 (gen *SLC45A2*). Oba označevalca SNP sta prisotna pri belopolti evropski populaciji, vendar znotraj le te prihaja do razlik v frekvenci posameznih alelov (Yuasa in sod., 2006). Gen *SLC45A2*, ki se nahaja na petem kromosому, kodira protein MATP (angl. membrane – associated transporter protein), ki sodeluje pri sintezi melanina v melanosomih in naj bi sodeloval tudi kot membranski prenašalec ter urejal transport drugih proteinov v sam melanosom. Mutacije gena v številnih raziskavah povezujejo s humanim obolenjem okulokutani albinizem tipa 4 (Soejima in Koda, 2007).

Pred kratkim so dostopili do 75 označevalcev SNP iz 24 genov, ki bi naj vplivali na barvo las, oči in polti v vzorcih različnih bio-geografskih izvorov. Trije označevalci SNP so podali najboljše rezultate za napovedovanje svetlih in temnih odtenkov barv las in oči (rs12913832 v *HERC2*, rs16891982 v *SLC45A2* in rs1426654 v *SLC24A5*) (Walsh in sod., 2013).

Gene, ki imajo le delni vpliv na pigmentacijske lastnosti je težko identificirati. Z napredkom na področju sekvenciranja in odkritja velikega števila označevalcev SNP je s pomočjo asociacijskih študij na celotnem genomu, GWAS (angl. Genome – wide association study), lažje identificirati več pigmentacijskih genov. Z asociacijskimi študijami iščemo povezave med fenotipom in velikim naborom označevalcev SNP v dani populaciji. Sistem HIrisPlex je bil razvit na takšen način na evropski populaciji in tako vpliva le za to populacijo, ki je med najbolj raziskanimi na tem področju (Walsh in sod., 2013). Sistem temelji na modelu logistične regresije, ki na podlagi 24 označevalcev SNP napove verjetnost pripadnosti posamezni skupini obarvanosti las in oči. Za obarvanost las in oči obstajata dva modela, in sicer multinominalni, ki je razdeljen v tri kategorije, in binarni model v dve kategoriji (Walsh in sod., 2011). Parametri tega modela so bili ocenjeni na podlagi razširjene baze podatkov HIrisPlex genotipov in fenotipskih podatkov za barvo las ($N=1,601$) in oči ($N=9,188$) (Walsh in sod., 2014).

Sposobnost napovedi specifične zunanje karakteristike posameznika neposredno s preiskavo bioloških sledi, zavarovanih predvsem pri težjih kaznivih dejanih, lahko pripomore kriminalističnim preiskavam, predvsem s tem, da se tekom preiskave omeji krog osumljenih. Obenem so preiskave zunanjih karakteristik lahko pomembne tudi pri preiskavi neznanih trupel oziroma njihovih okostij. Tako z vidika primerjanja z bazo fotografij pogrešanih oseb, kot tudi z arheološkega vidika, kot je bilo to npr. izvedeno s strani poljskih raziskovalcev (Draus-Barini in sod., 2013). Arheologi in antropologi, oddelka za antropologijo Univerze Jagiellonian, ki so opravljali izkopavanja na Poljskem, so odkrili ostanke dveh žensk, ki sta bili zakopani med menihi v srednjeveškem Benediktinskem samostanu v mestu Tyniec blizu mesta Krakow. Predpostavili so, da naj bi umrli med 12. in 14. stoletjem.

V nadaljevanju so forenzični genetiki iste univerze na podlagi DNA izolirane iz zoba napovedali, da naj bi ena izmed njiju, imela rjave oči in temne lase. Vodja oddelka za antropologijo, prof. Henryk Glab iz Univerze Jagiellonian in sodelavci so tako uporabo označevalcev SNP in njihovo povezanost s pigmentacijskimi lastnostmi uvedli tudi v arheološke preiskave. Potrdili so namreč, da lahko tudi na podlagi okostij, starih več sto let in iz njih izolirane DNA, določimo barvo las in oči pokojnih (Draus-Barini in sod., 2013). Sistem HIrisPlex je tako lahko uporaben na več različnih področjih, ne samo v forenzičnih preiskavah, ampak tudi v arheoloških (Walsh in sod., 2013).

2.1.1 Kategorizacija barve las in oči

Obarvanost las smo najprej razdelili v 7 skupin: svetlo plavolas, temno plavolas, rdečo rjava, rdeča, svetlo in temno rjava ter črna. V nadaljevanju smo te skupine razdelili v plavolaso, rdečo, rjavo in črno ter nato še v svetlo in temno skupino (Walsh in sod., 2013)



Slika 1: Prikaz različnih odtenkov plavolase (prva vrsta od zgoraj navzdol), rdeče (druga vrsta od zgoraj navzdol), rjave (tretja vrsta od zgoraj navzdol) in črne (četrta vrsta od zgoraj navzdol) barve las.

Walsh in sod. (2013) navajajo, da 22 različnih DNA ne vplivajo samo na barvo las, ampak tudi na različne odtenke, katere je težje napovedati. Z modelom HIrisPlex se poleg napovedi verjetnosti obarvanosti las, upoštevamo tudi verjetnost napovedi za svetlejši in temnejši odtenek. Napovedovanje odtenka služi kot dodatna informacija za končno kategoriziranje, in sicer za razlikuje svetlo plavolase od temno plavolase/temno rjave od črne barve las.

Obarvanost oči smo najprej kategorizirali v 8 skupin: svetlo in temno modra, modra z dodatkom rjave v šarenici, zelena, zelena z rjavim obročem, rjava z dodatkom zelene v šarenici, svetlo in temno rjava. V ožji kategorizaciji smo omenjene barve razdelili v modro, vmesno in rjavo, nato pa na svetlo in temno barvo oči (Walsh in sod., 2013).



Slika 2: Prikaz različnih odtenkov modre (prva vrsta od zgoraj navzdol), zelene (druga vrsta od zgoraj navzdol), in rjave (tretja vrsta od zgoraj navzdol) barve oči.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZBIRANJE VZORCEV IN FENOTIPSKIH PODATKOV

Za namene raziskave smo pridobili brise ustnih sluznic 100 nesorodnih prostovoljcev, ki so podpisali izjavo o sodelovanju, podali podatke o spolu in letu rojstva. Zbiranje brisov kot tudi celotna preiskava je bila potrjena s strani Komisije za medicinsko etiko.

Za odvzem brisov smo uporabili sterilne in DNA proste komplete SAFE Box kit (Forensics, Prionics AG, Zurich, Switzerland). Posamezen komplet vsebuje rokavice za enkratno uporabo, dve sterilni vatirani paličici, škatlo za hranjenje vzorca in tri rdeče pečatne nalepke. Prostovoljci so si nadeli rokavice in z vatiranim delom palčke podrgnili približno 20 - krat po notranji strani lica. Enako so storili z drugo palčko na drugi strani lica. Paličici so dali v kartonasto škatlo, z nasprotno ležečim vatiranim delom. Vatiranega dela se nismo dotikali, da ne bi prišlo do kontaminacije vzorca. Zapečateno škatlo smo hranili v suhem prostoru.

Za fotografijo las in oči smo uporabili fotoaparat Nikon D60 in nastavitev makro leče ($f=22$, $1/125$, iso 200). Povprečna razdalja med objektivom in lasmi oziroma očmi je bila približno 7 cm. Lase smo slikali iz hrbtnega dela. Poskušali smo zagotoviti optimalne osvetlitvene pogoje. Obarvanost las in oči smo pri vzemu vzorca kategorizirali v ustrezeno skupino, kot so opisane pod poglavjem kategorizacija barve las in oči.

3.2 IZOLACIJA DNA IZ BRISOV USTNIH SLUZNIC

Izolacijo DNA iz brisov ustnih sluznic smo izvedli po metodi Chelex, ki je primerna za biološke vzorce z dobro ohranjeno DNA (Nagdev in sod., 2010). Prisotnost kelatne smole v Chelex raztopini pri visoki temperaturi (56°C) in bazičnosti suspenzije ($\text{pH}= 10 - 11$) povzroči razbitje celičnih in jedrnih membran ter sprostitev DNA. Do razgradnje DNA ne pride, saj ne prihaja do vezave dvovalentnih ionov. Dvovalentni ioni delujejo kot katalizatorji razgradnje DNA, zaradi nizke ionske jakosti in visoke temperature. Mg^{2+} ioni so nujno potrebni za uspešen potek PCR reakcije, zato potrebujemo pH višji od 9. Kroglice Chelex je mogoče enostavno odstraniti, tako da ne ovirajo kasnejše reakcije PCR (Walsh in sod., 1991). Za učinkovitejšo razgradnjo celičnih membran smo dodali encim proteinaza K.

Ekstrakcija DNA iz sline po metodi Chelex:

- V izolacijo smo vzeli eno paličico brisa ustne sluznice, od katere smo odrezali polovico vatiranega dela in ga prenesli v 1,5 mL označeno mikrocentrifugirko,
- dodali 400 μL 5 - odstotne suspenzije Chelex, da je bil del vatirane palčke v celoti potopljen,
- mikrocentrifugirko smo 10 - sekund stresali na vibracijskem mešalniku in inkubirali 30 - minut pri 56°C ,
- nato smo jo ponovno stresali 10 – sekund in
- sledila je 8 – minutna inkubacija pri 100°C ,
- mikrocentrifugirko smo nato ponovno stresali 10 – sekund in
- centrifugirali 3 - minute pri 14 000 vrt/min.

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE DNA V VZORCIH

V vzorcih z izolirano DNA smo nato s pomočjo metode PCR v realnem času določili koncentracijo DNA. Za določanje koncentracije smo uporabili komercialni komplet Quantifiler (Human DNA Quantification Kit – AB), pri katerem se s pomočjo specifičnih začetnih oligonukleotidov pomnožuje gen za reverzno transkriptazo telomeraze (angl. human telomerase reverse transcriptase gene). Končna dolžina fragmentov je 62 baznih parov (Quantifiler kits..., 2005).

Protokol za PCR v realnem času smo izvedli po navodilih proizvajalca (Quantifiler kits..., 2005). Volumen reakcijske mešanice je znašal 25 µl in je vseboval:

- 12,5 µl mešanice "Quantifiler PCR Reaction Mix"
- 10,5 µl mešanice "Quantifiler Human Primer Mix"
- 2,0 µl forenzičnega vzorca ozziroma standarda.

Mešanica "Quantifiler PCR Reaction Mix" vsebuje dNTP-je, pufer, DNA - polimerazo AmpliTaq Gold in referenčni standard, označen s fluorescenčnim barvilom ROX. Druga mešanica "Quantifiler Human Primer Mix" pa vsebuje specifične začetne oligonukleotide ter sondi TaqMan MGB, označeno s fluorescenčnim barvilm 5' - FAM ter nefluorescenčnim dušilcem 3' - NQF. Vsebuje tudi interno kontrolo PCR (IPC) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi in sondi, označeno s fluorescenčnim barvilm 5' - VIC ter nefluorescenčnim dušilcem 3' - NQF, s katerim smo ugotavljali inhibicijo procesa (Quantifiler kits..., 2005).

Najprej smo v vdolbinice na mikrotiterski plošči nanesli 23 µl osnovne reakcijske mešanice. Nato, smo v prvih 16 vdolbinic dodali različne količine standardne sintetične DNA, v ostale pa po 2 µl izolirane DNA. V eni vdolbinici smo pripravili tudi negativno kontrolo ali slepi vzorec, ki je vseboval le 2 µl vode. Za zmanjšanje možnosti kontaminacije smo na pripravljeni plošči z vzorci nalepili plastično folijo in nato še pokrili z gumijastim pokrovčkom. Ploščo smo položili v napravo "ABI Prism 7000 Sequence Detection System" (Applied Biosystems). V preglednici 1 so podani pogoji pomnoževanja specifičnih genov (Quantifiler kits..., 2005).

Preglednica 1: Pogoji PCR v realnem času (Quantifiler kits..., 2005).

	Temperatura °C	Čas (s)	Število ciklov
Začetna denaturacija in aktivacija <i>Taq</i> gold DNA – polimeraze	95	600	
Denaturacija	95	15	
Prileganje in podaljševanje	60	60	40

Za razlago rezultatov smo uporabili programsko opremo "ABI Prism 7000 SDS Software" (Applied Biosystems), ki izriše standardno krivuljo, s pomočjo znanih koncentracij standardne sintetične DNA (Preglednica 2). Program s pomočjo linearne standardne krivulje določi koncentracijo našega vzorca.

Preglednica 2: Koncentracije standardne sintetične DNA (Quantifiler kits..., 2005).

Vzorec	Koncentracija (ng/ μ l)
1	50,000
2	16,700
3	5,560
4	1,850
5	0,620
6	0,210
7	0,068
8	0,023

3.4 POMNOŽEVANJE DNA

3.4.1 Pomnoževanje z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction – PCR) je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko kopij želenega odseka DNA (Arko, 2004). Začetni oligonukleotidi so ponavadi dolgi 20 - 30 nukleotidov in vežejo komplementarne nukleotide na 3' koncu DNA (Sridhar, 2012). Za PCR potrebujemo vzorec DNA, ki služi kot matrica, dva začetna oligonukleotida s katerima omejimo odsek, ki ga želimo pomnožiti, 4 deoksinukleozid – trifosfate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ki predstavljajo gradnike za nove verige DNA, Mg^{2+} ione, reakcijski pufer in termostabilno DNA – polimerazo. Najpogosteje se uporablja Taq DNA polimeraza (Arko, 2004). Taq DNA polimeraza je termostabilna, saj je izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus* (Sridhar, 2012).

Preglednica 3: Reakcijska mešanica za 12,23 mikrolitersko reakcijo PCR.

Reagenti	Volumen (μ l)	
10x PCR pufer	1,50	Osnovna mešanica
25 mM MgCl	1,00	
10 mM dATP	0,22	
10 mM dCTP	0,22	
10 mM dGTP	0,22	
10 mM dTTP	0,22	
5U/ μ l TaqPolim	0,70	3,5U/reakcijo
20 μ M PCR začetnih oligonukleotidov	7,15	0,2 – 0,275 za 37 začetnih oligonukleotidov
vzorec (DNA + voda)	1,00	2 ng DNA
Skupaj	12,23	

Klasično PCR pomnoževanje je v naši raziskavi potekalo s pomočjo naprave GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). DNA smo denaturirali pri 95° C 10 minut, sledilo je 33 ciklov pri 95° C po 30 sekund in pri 61° C 30 sekund, nazadnje sledi končna inkubacija, ki traja 5 minut pri 61° C (Walsh in sod., 2013). Z znižanjem temperature na okoli 61° C omogočimo delovanje DNA polimeraze, ki omogoča prilagajanje začetnih oligonukleotidov na enoverižno DNA, ki je nastala pri denaturaciji (Sridhar, 2012). Temperatura pri 61° C omogoči optimalno delovanje encima DNA polimeraze. Pri tem z dodajanjem nukleotidov nastaja ob matični DNA nova veriga DNA v smeri 5' proti 3' koncu. Odsek DNA se tako tekom več ciklov pomnoži na želeno količino (Arko, 2004). Končna dolžina PCR produktov je bila v okviru kompleta HIrisPlex od 106 bp do 185 bp.

Preglednica 4: Pogoji PCR.

Temperatura (°C)	Čas (s)	Število ciklov
95	600	33
95	30	
61	30	
61	300	
4	∞	

Preglednica 5: Informacije o 24 označevalcev SNP s pozicijo na kromosomu in pripadajočim genom, začetnim oligonukleotidom in koncentracijo za pomnoževanje DNA z metodo PCR (Walsh in sod., 2014).

Št.	SNP	Kromosom	Gen	Začetni oligonukleotidi	Koncentracija (μ M)
1	N29insA	16	MC1R	GCAGGGATCCAGAGAACAC	0,5
2	rs11547464	16	MC1R	TCAGAGATGGACACCTCCAG	0,5
3	rs885479	16	MC1R	CTGGTGAGCTTGGTGGAGA	0,5
4	rs1805008	16	MC1R	TCCAGCAGGAGGATGACG	0,5
5	rs1805005	16	MC1R	GTCCAGCCTCTGCTTCCTG	0,5
6	rs1805006	16	MC1R	AGCGTGCTGAAGACGACAC	0,5
7	rs1805007	16	MC1R	CAAGAACTTCAACCTTTCTCG	0,4
8	rs1805009	16	MC1R	CACCTCCTTGAGCGTCCTG	0,4
9	Y152OcH	16	MC1R		
10	rs2228479	16	MC1R		
11	rs1110400	16	MC1R		
12	rs28777	5	SLC45A2	TACTCGTGTGGAGTTCCAT	0,4
13	rs16891982	5	SLC45A2	TCTTGATGTCCCCTTCGAT	0,4
				TCCAAGTTGTGCTAGACCAGA	0,4
14	rs12821256	12	KITLG	CGAAAGAGGAGTCGAGGTTG	0,4
				ATGCCAAAGGATAAGGAAT	0,4
15	rs4959270	6	EXOC2	GGAGCCAAGGCATGTTACT	0,4
				TGAGAAATCTACCCCCACGA	0,4
16	rs12203592	6	IRF4	GTGTTCTTACCCCTGTGGA	0,4
				AGGGCAGCTGATCTCTTCAG	0,4
17	rs1042602	11	TYR	GCTTCGTATGGCTAACCT	0,4
				CAACACCCATGTTAACGACA	0,4
18	rs1800407	15	OCA2	GCTTCATGGCAAAATCAAT	0,4
				AAGGCTGCCTCTGTTCTACG	0,4
19	rs2402130	14	SLC24A4	CGATGAGACAGAGCATGATGA	0,4
				ACCTGTCTCACAGTGCTGCT	0,4
20	rs12913832	15	HERC2	TTCACCTCGATGACGATGAT	0,4
				TCAACATCAGGGTAAAAATCATGT	0,4
21	rs2378249	20	ASIP/PIGU	GGCCCTGATGATGATAGC	0,4
				CGCATAACCCATCCCTCTAA	0,4
22	rs12896399	14	SLC24A4	CATTGCTTTCAAGCCACAC	0,4
				CTGGCGATCCAATTCTTGT	0,4
23	rs1393350	11	TYR	GACCTGTGTGAGACCCAGT	0,4
				TTTCTTATCCCCCTGATGC	0,4
				GGGAAGGTGAATGATAACACG	0,4
24	rs683	9	TYRP1	CACAAAACCACCTGGTTGAA	0,4
				TGAAAGGGTCTCCAGCTT	0,4

3.4.2 Pomnoževanje posameznega nukleotida

Pri pomnoževanju posameznega nukleotida (angl. single base extension – SBE) smo uporabili metodo SNaPshotTM in komercialni komplet SNaPshotTM Multiplex Kit (AB) (ABI..., 2010). Pri tej metodi se neoznačeni začetni oligonukleotidi vežejo pred mestom točkovne mutacije, fluorescenčno označen ddNTP pa se veže na polimorfno mesto. Z dodajanjem nespecifičnih nukleotidnih repkov na 5'-konec minisekvenčnih začetnih oligonukleotidov omogočimo lažje kapilarno ločevanje produktov po dolžini in barvi. Minisekvenčni začetni okligonukleotidi so tvorili produkte dolžine med 25 in 65 baznih parov. Razdalja med posameznimi produkti je približno 5 baznih parov. (Sanchez in sod., 2003; Sobrino in sod., 2005).

Preglednica 6: Reakcijska mešanica za 10 mikrolitersko reakcijo pomoževanja SBE z metodo SNaPshotTM.

	Volumen (μ l)
Produkti PCR	2,00
SNaPshot multiplex	4,00
Začetni oligonukleotidi SBE	4,00
Skupaj	10,00

Preglednica 7: Pogoji pomnoževanja SBE pri metodi SNaPshotTM.

Temperatura (°C)	Čas (s)	Število ciklov
96	120	
96	10	
50	5	
60	30	
4	∞	25

Po prvem pomnoževanju PCR (produkti PCR) smo presežek začetnih oligonukleotidov in dNTP-jev odstranili z dodatkom sveže pripravljene mešanice dveh encimov, in sicer encima SAP (angl. Shrimp Alkaline Phosphotase) in encima Exo I (angl. E. Coli Exonuclease I) (ABgene). Po pomnoževanju posameznega nukleotida (produkti SBE) pa smo s pomočjo encima SAP skušali odstraniti čim več nevezanih začetnih oligonukleotidov in ddNTP-jev, da le ti ne bi motili končne analize SBE produktov (Kastelic in Drobnič, 2012a).

Preglednica 8: Priprava reakcijske mešanice za odstranjevanje začetnih oligonukleotidov in dNTP-jev po začetnem PCR-ju. Volumni so podani za en vzorec.

	Volumen (µl)
Produkti PCR	5,000
Sap	1,950
ExoI	0,039

Preglednica 9: Odstranjevanje začetnih oligonukleotidov in ddNTP-jev po pomnoževanju SBE. Volumni so podani za en vzorec.

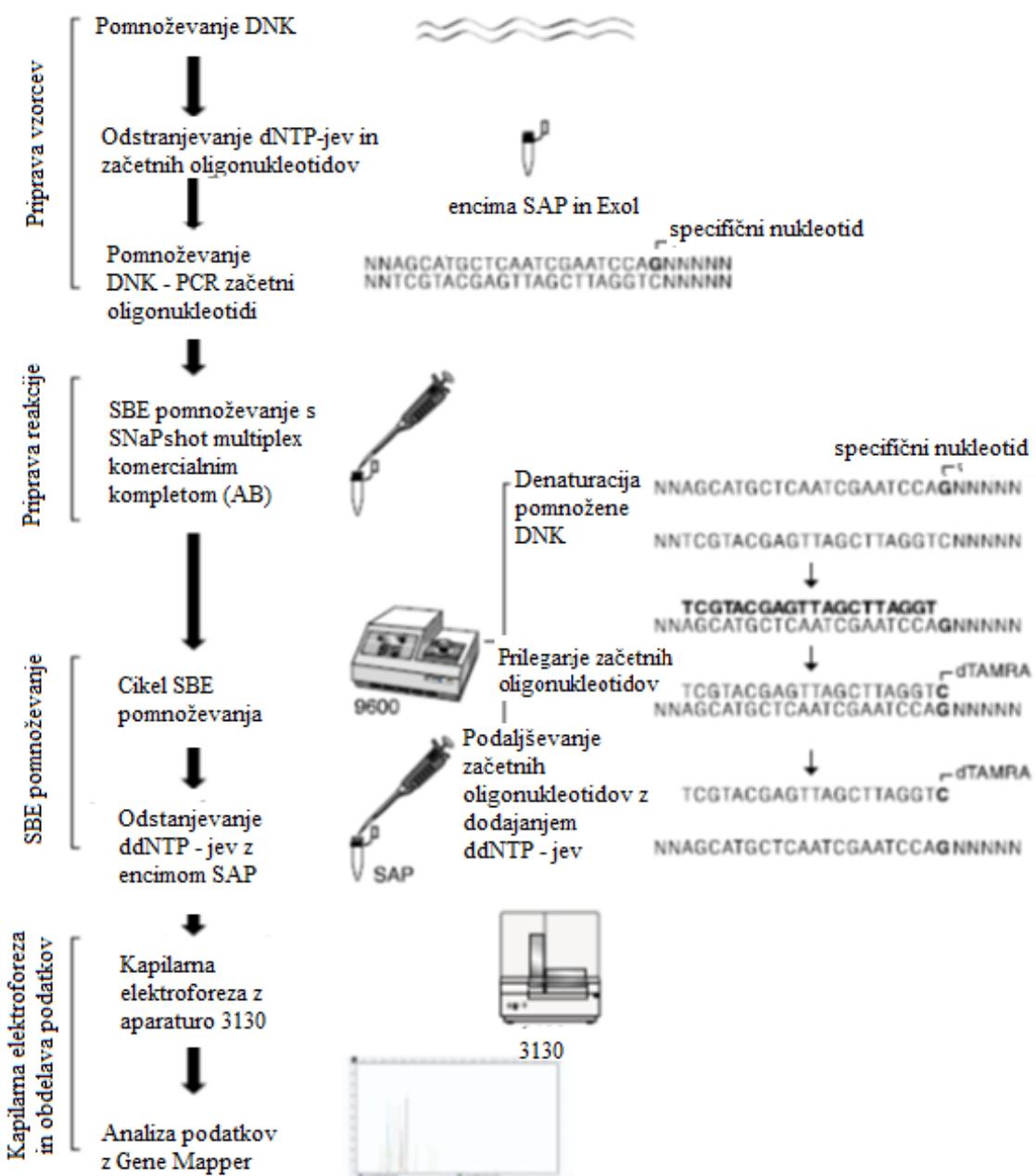
	Volumen (µl)
Produkti SBE	7,01
SAP (1 U/µl)	1,00

Preglednica 10: Temperaturni cikel za aktivacijo in deaktivacijo encima SAP.

Temperatura (°C)	Čas (min)
37	60
75	15
4	∞

Preglednica 11: Informacije o 24 označevalcev SNP, z osnovnim in alternativnim aleлом, začetnimi oligonukleotidi SBE in koncentracijami (Walsh in sod., 2014).

SNP	Osn. alel	Alt. alel	Začetni oligonukleotidi	Koncentracija (μ M)
N29insA	C	insA	CCAGCTGGGGCTGGCTGCCAA	1,3
rs11547464	G	A	tttttttttttGCCATCGCCGTGGACC	0,1
rs885479	C	T	ttttttttttttttttGATGGCCGCAACGGCT	1,25
rs1805008	C	T	tttttttttttttACAGCATCGTGACCCCTGCCG	0,375
rs1805005	G	T	ttttttttttttttTGGTGGAGAACCGCGTGGTG	1
rs1805006	C	A	ttttttttttttttttttCTGCCTGGCCTTGTCCGA	0,8
rs1805007	C	T	tttttttttttttttttttttCTCCATCTTCTACGCAGT	1,1
rs1805009	G	C	ttttttttttttttttttttttttttttttttATCTGCAATGCCATCATC	0,12
Y152OcH	C	A	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttCATCTTCTACGCAGT	0,5
			CTA	
rs2228479	G	A	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttCTGGTGAGCGGGA-	0,375
			GCAAC	
rs1110400	T	C	tttttttttttttttttttttttttttttttCTTCTACGCAGT	0,1
			GCCTGCGCT-	
			ACACAGCA	
rs28777	A	C	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttCATGTGATCCTC-	1,2
			ACAGCAG	
rs16891982	G	C	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttAAACACG-	0,9
			GAGTTGATGCA	
rs12821256	A	G	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttGGAGCCAAG-	0,12
			GGCATGTTACTACGGCAC	
rs4959270	C	A	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttGGAACACAT-	0,3
			CCAAACTATGACACTATG	
rs12203592	C	T	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttTCCACTTT-	0,2
			GGTGGGTAAAAGAAGG	
rs1042602	G	T	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttTCAAT-	1,25
			GTCTCTCCAGATTCA	
rs1800407	G	A	ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt-	0,1
			GCATACCGGCTCTCCC	
rs2402130	A	G	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttT-	0,75
			GAACCATAACGGAGCCCGTG	
rs12913832	C	T	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttTA-	1
			CGTGCAGAACTTGACA	
rs2378249	T	C	ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt-	0,1
			CCACACCTCTCCTCAGCCCCA	
rs12896399	T	G	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttT-	1
			CTTAGGTCACTATTGAGG	
rs1393350	C	T	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt-	1,1
			CATTTGTAAAAGACCACACAGATT	
rs683	T	G	tttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt-	0,3
			GCTTGAAAAGTATGCCTAGAACATTAAAT	



Slika 3: Shematski prikaz celotnega postopka analize označevalcev SNP (ABI PRISM SNaPshot™ Multiplex Kit..., 2010).

3.5 KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Za ločevanje minisekvenčnih produktov pomnoževanja smo uporabili genetski analizator ABI Prism 3130 (AB) na osnovi kapilarne elektroforeze s 36 cm dolgo kapilaro. Kapilarna elektroforeza je postopek, ki se uporablja za ločevanje pomnoženih produktov DNA. Poteka po principu elektrokinetike (gibanje zaradi električnega polja). Produkte SBE injiciramo v kapilaro, ki je napolnjena s tekočim polimerom POP – 7 (angl. performance optimized polymer - POP). Produkti SBE, ki se med seboj ločijo le za nekaj baznih parov potujejo po kapilari. In sicer krajši fragmenti potujejo hitreje kot daljši. Visoka napetost, ki jo dodajamo k vzorcem prisili negativno nabite delce, da potujejo po kapilari. Na elektoforetično mobilnost vzorcev lahko vpliva več dejavnikov: pufer, koncentracija produktov pomnoževanja, pH, temperatura, velikost napetosti in tip polimera. Preden fluorescentno označeni produkti pomnoževanja dosežejo pozitivno elektrodo (anoda) se pomikajo skozi detektor. Znotraj tega detektorja so fluorescentno označeni produkti presvetljeni z laserskim žarkom, ki povzroči, da barvilo, ki je pripeto na fragmente, fluorescira. Barvni signali so ločeni z lomilcem svetlobe in CCD (angl. charge – coupled device) kamero, ki odkrije fluorescenco. Vsako barvilo sprošča svetlobo drugačne valovne dolžine, ko ta prečka laser. Podatke obdela računalniški program na osnovi analiznih algoritmov. Analogni oz. zvezni signal se pretvori v digitalno obliko. Prikaz podatkov je v obliki elektroferograma (DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis..., 2012).

Velikosti posameznih produktov SBE določimo z uporabo znanega velikostega standarda (120 LIZ), tako da je bila dolžina fragmentov od 15 do 120 bp. Vsemu biološkemu vzorcu smo določili haplotip za vseh štiriindvajset označevalcev SNP s programom GeneMapper ID version 3.2.1.

Za delo z našimi vzorci smo pripravili mešanico s 8,5 µl formamida (formamid denaturira DNA) in 0,5 µl 120 LIZ . Pripravljeno mešanico smo odpipetirali v vsako vdolbinico mikrotiterske plošče in dodali 1 µl vzorca (produktov SBE). Centrifugiranje je potekalo 5 - minut pri 95° C in 2 minuti pri 0° C.

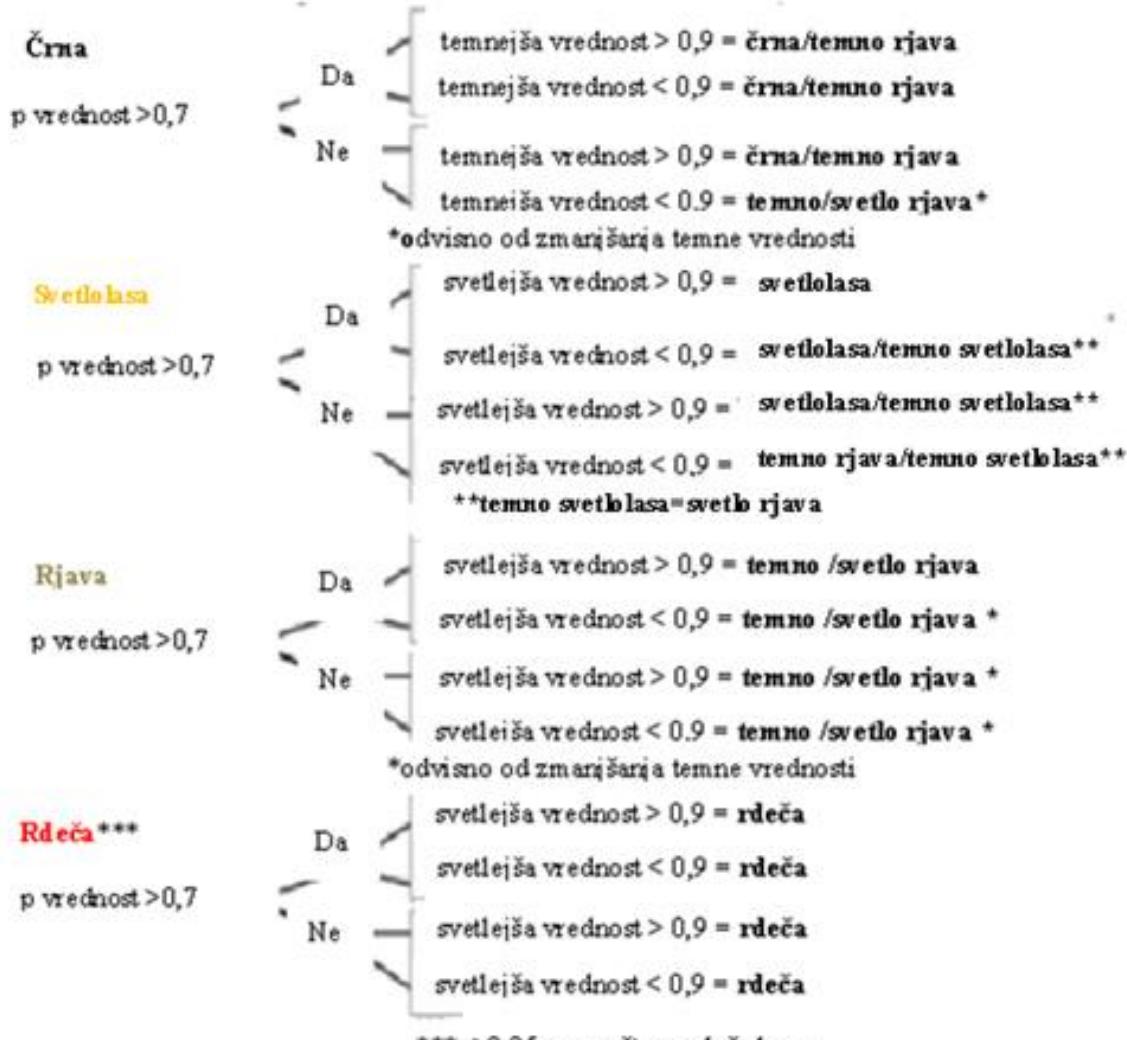
3.6 GENOTIPIZACIJA IN NAPOVED OBARVANOSTI LAS IN OČI

Testno skupino je sestavljalo 100 vzorcev za katere smo pregledali elektroferograme in ocenili razliko v višini vrhov na grafu ter s tem določili homozigotni ali heterozigotni genotip. Za obdelavo podatkov smo uporabili tabelo v programu Excel, v katero smo vnašali število alternativnih alelov (0 – homozigot za osnovni model, 1 - heterozigot, 2 – homozigot za alternativni alel, NA - če genotipa nismo mogli določiti) za vsakega izmed 24 označevalcev SNP. Iz izbranih genotipov smo nato izračunali frekvence alelov po metodi štetja in jih primerjali s frekvencami alelov HapMap oziroma podatki širše evropske kavkazijske populacije (CEU na portalu NCBI SNP). Podatke o značilnostih označevalcev SNP, alelnih in genotipskih frekvencah v različnih populacijah je zbral mednarodni konzorcij SNP (International HapMap Consortium). Za nekatere od njih so tudi že izvedene validacijske študije. Vsi podatki so na voljo v spletnih katalogih HapMap. Podatki širše evropske kavkazijske populacije (CEU) izvirajo od posameznikov zvezne države Utah (ZDA), ki imajo prednike iz severne in zahodne Evrope (Giampaoli in sod., 2012).

Excelovo datoteko smo nato pretvorili v CSV format in jo naložili na spletno stran HIrisPlex - »HIrisPlex Eye and Hair Colour DNA Phenotyping Webtool« (<http://www.erasmusmc.nl/47743/3604975/HIris?lang=en>), ki smo jo uporabili za izračun verjetnosti pojavljanja plavolase, rdeče, rjave in črne barve las ter modre, vmesne in rjave barve oči. Model poda tudi verjetnost pojavljanja svetlih in temnih odtenkov las, ki smo jih uporabili za dokončno napovedi obarvanosti las (Slika 4). Napovedi, ki so imele vsaj 70 % verjetnost za dejansko obarvanost las in oči posebej, smo označili kot pravilne in kot nepravilne v nasprotnem primeru (Walsh in sod., 2013).

Napoved barve las...

= najverjetnejša barva las



črna/temno rjava

temno/svetlo rjava

svetlolasa/temno svetlolasa

Slika 4: HIrisPlex pripomoček za napovedovanje barve las na osnovi verjetnosti (p vrednost) pojavljanja posameznih barv (Walsh in sod., 2013).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 FREKVENCE ALELOV

S primerjavo frekvenc alelov 23 označevalcev SNP (v bazi ni podatka edino za označevalce SNP Y152OCH) s frekvencami predstavljenimi za kavkazijsko populacijo smo lahko ugotovili, da ni bistvenega odstopanja. Odstopanja so v smiselnem okviru, kar pa seveda lahko pripisemo predvsem številu oseb (100) v vzorcu slovenske populacije (Preglednica 12).

Pri štirih označevalcih SNP (rs1805006, rs1110400, Y152OCH in rs1805009) in pri inserciji N29insA za našo populacijo nismo zaznali polimorfnosti. Torej je teh pet označevalcev SNP manj informativnih za določanje obarvanosti las in oči za našo populacijo.

Iz vsega omenjenega pa torej lahko povzamemo, da na podlagi teh frekvenc slovenska populacija pripada širši evropski kavkazijski populaciji.

Preglednica 12: Frekvence alelov za 24 označevalcev SNP na vzorcih iz Slovenije (SLO) in HapMap (CEU)

SNP	Alel	SLO	HapMap (CEU)
N29insA	C	1,000	1,000
	insA	0,000	0,000
rs11547464	G	0,955	1,000
	A	0,045	0,000
rs885479	C	0,940	0,900
	T	0,060	0,100
rs1805008	C	0,940	0,935
	T	0,006	0,064
rs1805005	G	0,970	0,924
	T	0,030	0,076
rs1805006	C	1,000	1,000
	A	0,000	0,000
rs1805007	C	0,950	0,879
	T	0,005	0,121
rs1805009	G	1,000	0,852
	C	0,000	0,148
Y152OCH	C	1,000	/
	A	0,000	/
rs2228479	G	0,930	0,934
	A	0,070	0,066
rs1110400	T	1,000	0,968
	C	0,000	0,032
rs28777	A	0,945	0,978
	C	0,055	0,022
rs16891982	G	0,800	0,983
	C	0,200	0,017
rs12821256	A	0,910	0,854
	G	0,090	0,146
rs4959270	C	0,595	0,487
	A	0,405	0,513
rs12203592	C	0,910	0,833
	T	0,090	0,167
rs1042602	G	0,625	0,571
	T	0,375	0,429
rs1800407	G	0,915	0,933
	A	0,085	0,067
rs2402130	A	0,820	0,810
	G	0,180	0,190
rs12913832	C	0,640	0,792
	T	0,360	0,208
rs2378249	T	0,875	0,858
	C	0,125	0,142
rs12896399	G	0,665	0,429
	T	0,335	0,571
rs1393350	C	0,715	0,774
	T	0,285	0,226
rs683	G	0,355	0,332
	T	0,645	0,668

4.2 USPEŠNOST NAPOVEDI OBARVANOSTI LAS

Rezultati napovedovanja obarvanosti las so predstavljeni s pomočjo štirih posameznikov, ki smo jih kategorizirali v različne skupine obarvanosti las in oči in s tem določili dejanski fenotip, ki ga želimo napovedati. Pod sliko 5 in 6 so prikazane izračunane verjetnosti za posamezno barvo las in oči na osnovi sistema HIrisPlex teh posameznikov. Barve in odtenki z najvišjo verjetnostjo so ustrezeno barvno označene. V prilogi A1, A2, in A3 so podane verjetnosti za vseh 100 zbranih vzorcev.

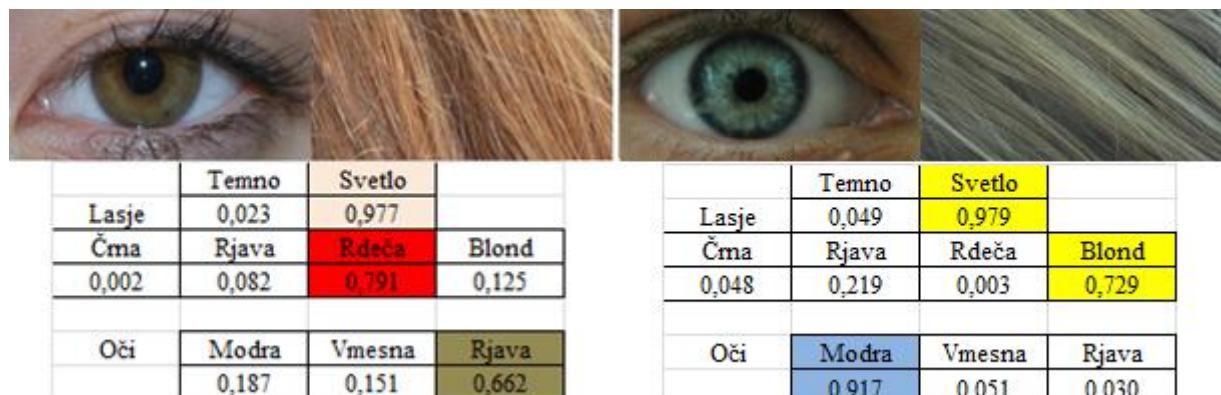
Slika 5 (levo) predstavlja posameznika s črno/temno rjavo barvo las in oči. Takšnih posameznikov s črno/temno rjavo barvo las je bilo skupaj 34 in za to skupino smo pravilno napovedali barvo las v 28 primerih, oziroma v 82,3 %. Posameznikov z rjavo barvo las (Slika 5; desno) smo zbrali 39 in za to skupino pravilno napovedali barvo las v 33 primerih, oziroma v 84,6 %.

	Temno	Svetlo	
Lasje	0,872	0,128	
Črna	Rjava	Rdeča	Blond
0,562	0,379	0,002	0,057
Oči	Modra	Vmesna	Rjava
	0,000	0,012	0,988

	Temno	Svetlo	
Lasje	0,558	0,442	
Črna	Rjava	Rdeča	Blond
0,211	0,614	0,001	0,175
Oči	Modra	Vmesna	Rjava
	0,091	0,141	0,768

Slika 5: Primer dveh posameznikov z rjavimi očmi in črnimi (levo) ter rjavimi (desno) lasmi in pripadajoče vrednosti za posamezno barvo las in oči na osnovi sistema HIrisPlex.

Slika 6 (levo) predstavlja posameznika z rdečo barvo las in rjavo barvo oči. Takšni posamezniki z rdečo barvo las so bili 3 in za to skupino smo pravilno napovedali barvo las v 1 primeru, oziroma v 33,3 %. Posameznikov s svetlolaso barvo las (Slika 6; desno) smo zbrali 24 in za to skupino pravilno napovedali barvo las v 22 primerih, oziroma v 91,7 %.



Slika 6: Primer dveh posameznikov z rjavimi (levo) in modrimi (desno) očmi in rdečimi (levo) ter plavolasimi (blond) lasmi in pripadajoče verjetnosti za posamezno barvo las in oči na osnovi sistema HIrisPlex.

Najbolje smo napovedali plavolaso barvo las s 91,7 %, nato rjavo barvo las s 84,6 %, črno barvo las s 82,3 % in najslabše pa smo napovedali rdečo barvo s 33,3 %. V celoti smo tako z metodo HIrisPlex pravilno napovedali barvo las za 84 % zbranih vzorcev. Z uporabo istega testa so Walsh in sodelavci (2013) pravilno napovedali svetlolaso barvo las v 69,5 %, rjavo barvo las v 78,5 %, rdečo barvo las v 80 % in črno barvo las 87,5 %.

Trenutne omejitve sistema HIrisPlex so pri napovedovanju barv las, ki se skozi leta odraščanja spremeni (iz plavolase na svetlo rjavo barvo, iz rjave na temno rjavo/črno in sivo) na nekoliko svetlejši/temnejši odtenek. Pri tem se pojavi težava pri ločevanju črne in temno rjave ali temno svetlolase in rjave barve las zaradi podobnosti oziroma majhnih razlik v odtenku. Trenutno označevalcev SNP, ki bi bili povezani s takšnimi spremembami obarvanosti skozi čas še ne poznamo. Walsh in sod., (2013) in Walsh in sod., (2014) predvidevajo, da gre najverjetneje za hormonalne spremembe npr., na nivoju izražanja vpletenih genov, ki pa še niso poznane.

4.3 USPEŠNOST NAPOVEDI OBARVANOSTI OČI

Rezultate napovedovanja obarvanosti oči na osnovi sistema HIrisPlex smo prikazali v zaporedju od najvišje verjetnosti za modre barve oči (Bl; Slika 7), preko vmesne barve oči (Int; Slika 8) do najvišje verjetnosti za rjavo barvo oči (Br; Slika 9). Slike so tako urejene od večje verjetnosti v levem zgornjem kotu proti nižji verjetnosti v desnem spodnjem kotu. Informacije o fenotipu nismo upoštevali pri urejevanju vrstnega reda slik. Pod vsako sliko smo krepko označili barvo z največjo verjetnosti. V oklepaju je navedena številka vzorca. Rdeč okvir označuje primere z nepravilno napovedjo.

V prvi skupini (Slika 7) smo imeli 43 posameznikov, ki smo jih kategorizirali pod modro barvo oči. Verjetnosti pojavljanja modre barve oči je bila v tej skupini večja kot 0,7 pri 42 posameznikih kar pomeni, da smo obarvanost modre barve oči napovedali pravilno v 97,7 % primerih.



Slika 7: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z modro obarvanimi očmi.

V drugi skupini (Slika 8) smo imeli 17 posameznikov, ki smo jih kategorizirali pod vmesno barvo oči. V tej skupini nismo pravilno napovedali obarvanost niti enega posameznika, saj verjetnosti niso bile večje kot 0,7 za vmesno (Int) barvo oči.



Slika 8: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z vmesno obarvanimi očmi.

V tretji skupini (Slika 9) smo imeli 40 posameznikov, ki smo jih kategorizirali pod rjavo barvo oči. Verjetnosti pojavljanja za rjavo barvo oči je bila v tej skupini večja kot 0,7 pri 35 posameznikih kar pomeni, da smo obarvanost rjave barve oči napovedali pravilno v 87,5 % primerih.



Slika 9: Verjetnosti za posamezno barvo oči na osnovi sistema HIrisPlex pri posameznikih z rjavo obarvanimi očmi.

V celoti smo tako z metodo HIrisPlex pravilno napovedali barvo oči za 77 % zbranih vzorcev. Najslabše smo napovedali vmesno barvo oči, in sicer zelene oči z rjavim obročem, rjave oči z zelenim obročem, zelene z rjavimi pikami, rjave z zelenorjavim obrobo. Pri vmesni obarvanosti oči smo vseh 17 vzorcev nepravilno napovedali. Če se omejimo samo na rezultate za modro in rjavo skupino, potem je uspešnost napovedi bistveno boljša, kar 92,8 %. Walsh in sod. (2014) navajajo, da lahko s HIrisPlex metodo pravilno napovemo barvo oči v 84 % primerih in da lahko uspešnost napovedi povečamo na 93 % kadar ocenujemo le rjavo in modro kategorizirane vzorce.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila nepravilno napovedana barva oči predvsem za vmesno kategorijo obarvanosti oči, saj ob večji prisotnosti rjavega pigmenta (pike, obrobe,...) sistem HIrisPlex napove rjavo barvo oči, ki se ne sklada z dejanskim stanjem. Walsh in sod. (2013) navajajo, da so samo v 14 % pravilno napovedali vmesno barvo oči, vendar ob neupoštevanju prej določenega mejnega praga 0,7 in izpostavili, da za napovedovanje vmesne barve oči še ne poznamo kvalitetnih DNA označevalcev.

Na osnovi polimorfnosti 24 označevalcev SNP smo obarvanost las pravilno napovedali v 84 % in obarvanost oči v 77 % primerih. Na obarvanost las in oči ne vpliva samo genotip, ampak tudi okoljski faktorji, kot so svetloba in oddaljenost od ekvatorja. Populacije, ki so bolj oddaljene od ekvatorja, imajo svetlejšo polt, svetlejše lase in oči (Mackey in sod., 2011). V kolikor dejanska barva las posameznikov ni znana lahko potrdimo splošno prepričanje, da posamezniki, ki so oddaljeni od Evrope ter njenih sosednjih regij kažejo fenotip črnih las (Walsh in sod., 2013).

5 SKLEPI

Na podlagi našega raziskovalnega dela s sistemom HIrisPlex smo prišli do naslednjih sklepov:

- Sistem HIrisPlex temelji na 24 polimorfizmih v enajstih genih, ki so jih prvič raziskovali na področju zunanjih karakteristik v povezavi s pigmentacijskimi obolenji pri ljudeh (albinizem).
- Po dosedanjih študijah so najbolj informativni geni: gen *OCA2*, gen *HERC2* in celotna regija *HERC2/OCA2* za napovedovanje modre in rjave barve oči in gen *MC1R* za napovedovanje barve las.
- Asociacijske študije celotnega genoma pomembno prispevajo k odkrivanju in identifikaciji pigmentacijskih genov.
- Označevalci N29insA, rs1805006, rs1110400, Y152OCH in rs1805009 niso kazali polimorfnosti. S tem je delovna hipoteza 1, da je v slovenski populaciji prisoten polimorfizem na 24 izbranih označevalcih SNP zavrnjena.
- V naši raziskavi je metoda HIrisPlex zanesljiva v 84 % za obarvanost las in 77 % za obarvanost oči v slovenski populaciji, zato lahko delno potrdimo delovno hipotezo 2.
- Za napovedovanje modre in rjave barve oči imamo zanesljive označevalce SNP, medtem ko napovedovanje vmesne barve oči s trenutnim naborom označevalcev ni možno.

6 POVZETEK

Sistem HIrisPlex je osnovan na 24 označevalcih SNP v enajstih genih in temelji na modelu logistične regresije za napovedovanje verjetnost pripadnosti posamezni skupini obarvanosti las in oči. Parametri tega modela so bili ocenjeni na podlagi razširjene baze podatkov HIrisPlex genotipov in fenotipskih podatkov za barvo las ($N=1,601$) in oči ($N=9,188$) (Walsh in sod., 2014).

Z našo preiskavo smo želeli preučiti uporabnost napovedi s sistemom HIrisPlex v Sloveniji, zato smo v ta namen na začetku pridobili potrditev s strani Komisije za medicinsko etiko. Za raziskavo smo zbrali brise ustnih sluznic 100 nesorodnih prostovoljcev ter sliko las in oči. Za našo analizo smo izolirali DNA, določili koncentracijo s pomočjo metode PCR v realnem času, nato je sledilo pomnoževanje DNA (PCR in SBE) in na koncu kapilarna elektroforeza. Po pregledu elektroferogramov za testno skupino smo določili genotip za vsakega izmed 24 označevalcev SNP, izračunali frekvence alelov po metodi štetja in jih primerjali s frekvencami alelov za širšo evropsko kavkazijsko populacijo (CEU) (Giampaoli in sod., 2012). Na podlagi manjših odstopanj lahko potrdimo, da slovenska populacija pripada širši evropski kavkazijski populaciji, čeprav pri petih označevalcih SNP nismo zaznali polimorfnosti.

S pomočjo spletne strani HIrisPlex smo izračunali verjetnosti napovedi za posamezni vzorec ter napovedi primerjali z zbranimi fenotipskimi podatki (slika). Napovedi, ki so imele vsaj 70 % verjetnost za dejansko obarvanost las in oči posebej, smo označili kot pravilne (Walsh in sod., 2013). Obarvanost las smo pravilno napovedali v 84 % in obarvanost oči v 77 % primerih. Trenutne omejitve se kažejo v pomanjkanju ustreznih označevalcev SNP za boljše napovedovanje spreminjaanja odtenkov las skozi leta odraščanja in vmesnih barv oči.

Za zanesljivo napovedovanje barve las in oči je potrebno še dodatno raziskati gene, da bodo te omejitve presežene (Walsh in sod., 2013, Walsh in sod., 2014). Menim, da so raziskave na področju napovedovanja pigmentacijskih značilnosti, predvsem pigmentacijski obarvanosti las in oči zelo obetavne.

7 VIRI

ABI PRISM®SNaPshot™ Multiplex Kit. Protocol. 2010. Foster City (CA), Applied Biosystems: 50 str.

Allwood S., J. Harbison S. 2013. SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Science International Genetics*, 7: 444–452

Arko B. 2004. Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmacevtski Vestnik*, 55: 215-220

Branicki W., Brudnik U., Draus-Barini J., Kupiec T., Wojas-Pelc A. 2008. Association of the SLC45A2 gene with physiological human hair colour variation. *Journal of Human Genetics*, 53: 966-971

DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. 2012. Applied Biosystems by Life Technologies: 18 str.

<http://www.unbc.ca/sites/default/files/sections/genetics/microsat.pdf> (12. dec. 2014)

Draus-Barini J., Walsh S., Pospiech E., Kupiec T., Glab H., Branicki W., Kayser M. 2013. Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics*, 4, 3: 1-15

Eiberg H., Troelsen J., Nielsen M., Mikkelsen A., Mengel-From J., Kjaer K. W., Hansen L. 2008. 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*, 123: 177-187

Giampaoli S., Chillemi G., Valeriani F., Lazzaro D., Borro M., Gentile G., Simmaco M., Zanni G., Berti A., Romano Spica V. 2012. The SNPs in the human genetic blueprint era. *New Biotechnology*, 30, 5: 475-484

Kastelic V., Drobnič K. 2012a. A single-nucleotide polymorphism (SNP) multiplex system: the association of five SNPs with human eye and hair color in the Slovenian population and comparison using a Bayesian network and logistic regression model. *Forensic Science. Croatian Medical Journal*, 53: 401-408

Kastelic V., Drobnič K. 2012b. Določitev zunanjega videza ljudi s preiskavami DNA. *Revija za kriminalistiko in kriminologijo*, 63, 3: 225–228
http://www.policija.si/images/stories/Publikacije/RKK/PDF/2012/03/RKK2012-03_Kastelic_Drobnič_DolocitevZunanjegaVidezaLjudi.pdf (11. nov. 2014)

Mackey A. D., Wilkinson H. C., Kearns S. L., Hewitt W. A. 2011. Classification of iris colour: review and refinement of a classification schema. *Clinical and experimental Ophthalmology*, 39: 462–471

Martinez-Cadenas C., Pena-Chilet M., Ibarrola-Villava M., Ribas G. 2013. Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model. *Forensic Science International: Genetics*, 7: 453-460

Mengel-From J., Borsting C., Sanchez J. J., Eiberg H., Morling N. 2008. Determination of cis/trans phase of variations in the MC1R gene with allele-specific PCR and single base extension. *Electrophoresis*, 29: 4780-4787

Nagdev J. K., Kashyap R. S., Deshpande P. S., Purohit J. H., Taori M. G., Dagnawala F. H. 2010. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100® extracted DNA samples. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 14, 8: 1032–1038

Quantifiler kits. 2005. Perkin-Elmer Applied Biosystems. User's manual. Foster City, The Perkin-Elmer Corporation: 10 str.

Rees J.L. 2000. The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Research*, 13: 135-140

Sanchez J. J., Borsting C., Hallenberg C., Buchard A., Hernandez A., Morling N. 2003. Multiplex PCR and minisequencing of SNPs – a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Science International*, 137: 74-84

Sobrino B., Brion M., Carracedo A. 2005. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*, 154: 181-194

Soejima M., Koda Y. 2007. Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. *International Journal of Legal Medicine*, 121, 1: 36-39

Sridhar Rao P. N. 2012. Polymerase Chain Reaction (PCR). Department of Microbiology, Davangere, 6 str.

<http://www.microrao.com/micronotes/pg/PCR.pdf> (25. sep. 2014)

Sturm R. A., Frudakis T. N. 2004. Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends in Genetics*, 20, 8: 327-332

Sulem P., Gudbjartsson F., Stacey S. N., Nelgason A., Rafnar T., Magnusson K. P. Manolescu A., Karason A., Palsson A., Thorleifsson G., Jakobsdottir M., Steinberg S., Palsson S., Jonasson F., Sigurgeirsson B., Thorisdottir K., Ragnarsson R., Benediktsdottir K. R., Aben K. K., Kiemeney L. A., Olafsson J. H., Gulcher J., Kong A., Thorsteinsdottir U., Stefansson K. 2007. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nature Genetics*, 39, 12: 1443-1452

Valenzuela R.K., Henderson M.S., Walsh M.H., Garrison N.A., Kelch J.T., Cohen-Barak O. Erickson D. T., Meaney J., Walsh J. B., Cheng K. C., Ito S., Wakamatsu K., Frudakis T., Thomas M., Brilliant M. H. 2010. Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *Journal of Forensic Science*, 55, 2: 315-322

Valverde P., Healy E., Jackson I., Rees J.L., Thody A.J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics*, 11: 328-330

Walsh P. S. , Metzgel D. A., Higuchi R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR – based typing from forensic material. BioTehniques, 10, 4: 506-513

Walsh S., Liu F., Ballantyne N. K., Mannis van Oven, Lao O., Kayser M. 2011. IrisPlex: A sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. Forensic Science International: Genetics, 5: 170-180

Walsh S., Liu F., Wollstein A., Kovatsi L., Ralf A., Kosiniak-Kamysz A., Branicki W., Kayser M. 2013. The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. Forensic Science International: Genetics, 7: 98-115

Walsh S. 2013. DNA Phenotyping: The Prediction of Human Pigmentation Traits from Genetic Data. Erasmus Universiteit Rotterdam: 360 str.
<http://repub.eur.nl/pub/40312/> (15. nov. 2014)

Walsh S., Chaitanya L., Clarisse L., Wirken L., Draus-Barini J., Kovatsi L., Maeda H., Ishikawa T., Sijen T., Knijff de P., Branicki W., Liu F., Kayser M. 2014. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA – based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. Forensic Science International: Genetics, 9: 150-161

Yuasa I., Umetsu K., Harihara S., Kido A., Miyoshi A. 2006. Distribution of the F374 allele of the SLC45A2 (MATP) gene and founder-haplotype analysis. Annals of Human Genetics, 70: 802-811

Zaumsegel D., Rothschild M. A., Schneider P. M. 2008. SNPs for the analysis of human pigmentation genes – a comparative study. Forensic Science International, 1: 544-546

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju, doc. dr. Gregorju Gorjanc, za strokovno svetovanje in končni pregled naloge.

Zahvaljujem se somentorici, prof. dr. Katji Drobnič, za strokovno vodenje, natančen in hiter pregled magistrske naloge.

Hvala doc. Vanji Kastelic za vso pomoč, čas in potrpežljivost pri laboratorijskem delu in pregledu rezultatov.

Hvala staršem, ki so mi omogočili študij in me podpirali.

Hvala Matjažu za vso podporo tekom študija in v zasebnem življenju.

Hvala vsem prijateljem, ki mi stojite ob strani.

Hvala vsem prostovoljcem za sliko las ter oči in odobritev analize vzorca.

PRILOGE

Priloga A1: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 1 do 34.

Zaporedna številka	Številka vzorca	Barva				Odtmek		Kategorizacija*
		Svetlolasta	Rjava	Rdeča	Črna	Svetel	Temen	
1	1	0,53	0,32	0,00	0,15	0,80	0,20	3
2	2	0,49	0,34	0,00	0,17	0,83	0,17	3
3	4	0,80	0,14	0,04	0,02	0,98	0,02	2
4	6	0,36	0,52	0,00	0,11	0,70	0,30	3
5	7	0,15	0,81	0,01	0,04	0,78	0,22	3
6	8	0,73	0,22	0,00	0,05	0,95	0,05	1
7	11	0,47	0,39	0,00	0,14	0,80	0,20	1
8	13	0,08	0,70	0,00	0,21	0,24	0,76	4
9	18	0,19	0,55	0,00	0,26	0,53	0,47	4
10	19	0,39	0,46	0,00	0,15	0,74	0,26	4
11	23	0,62	0,11	0,27	0,00	1,00	0,00	1
12	25	0,18	0,55	0,00	0,27	0,42	0,58	3
13	27	0,41	0,46	0,00	0,13	0,81	0,19	4
14	31	0,41	0,45	0,00	0,13	0,81	0,19	3
15	33	0,32	0,58	0,00	0,10	0,73	0,27	3
16	34	0,43	0,48	0,00	0,09	0,79	0,21	4
17	35	0,02	0,86	0,01	0,11	0,18	0,82	4
18	36	0,05	0,36	0,00	0,59	0,12	0,88	4
19	44	0,82	0,16	0,00	0,02	0,98	0,02	4
20	48	0,57	0,31	0,07	0,05	0,94	0,06	1
21	50	0,58	0,35	0,00	0,07	0,90	0,10	1
22	51	0,21	0,58	0,00	0,21	0,42	0,58	3
23	54	0,53	0,41	0,01	0,05	0,88	0,12	1
24	56	0,75	0,13	0,11	0,01	0,99	0,01	1
25	58	0,39	0,49	0,00	0,12	0,73	0,27	3
26	59	0,44	0,39	0,00	0,16	0,79	0,21	3
27	62	0,65	0,24	0,06	0,05	0,94	0,06	1
28	64	0,19	0,76	0,00	0,04	0,77	0,23	1
29	65	0,26	0,57	0,00	0,17	0,53	0,47	3
30	67	0,31	0,57	0,01	0,11	0,72	0,28	3
31	69	0,72	0,24	0,00	0,04	0,95	0,05	1
32	71	0,14	0,47	0,00	0,39	0,27	0,73	4
33	72	0,20	0,63	0,03	0,14	0,69	0,31	3
34	73	0,11	0,49	0,00	0,40	0,21	0,79	4

*Kategorizacija (1 – plavolasta, 2 – rdeča, 3 – rjava, 4 – temno rjava/črna). Krepko označene številke predstavljajo nepravilno napoved v primerjavi s subjektivno oceno slike las.

Priloga A2: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 35 do 68.

Zaporedna številka	Številka vzorca	Barva				Odtotenek		Kategorizacija*
		Svetlolasta	Rjava	Rdeča	Črna	Svetel	Temen	
35	75	0,81	0,17	0,00	0,01	0,98	0,02	1
36	77	0,11	0,68	0,00	0,21	0,27	0,73	3
37	80	0,76	0,22	0,01	0,02	0,98	0,02	1
38	81	0,60	0,31	0,00	0,09	0,89	0,11	3
39	82	0,10	0,45	0,00	0,44	0,18	0,82	3
40	84	0,67	0,30	0,00	0,03	0,94	0,06	1
41	83	0,78	0,12	0,08	0,01	0,99	0,01	1
42	86	0,40	0,40	0,00	0,19	0,73	0,27	3
43	87	0,67	0,29	0,01	0,03	0,94	0,06	1
44	92	0,67	0,32	0,01	0,01	0,97	0,03	2
45	99	0,76	0,19	0,00	0,05	0,94	0,06	1
46	101	0,41	0,48	0,00	0,10	0,76	0,24	3
47	102	0,67	0,29	0,00	0,04	0,92	0,08	3
48	103	0,31	0,51	0,00	0,18	0,59	0,41	3
49	104	0,29	0,60	0,00	0,11	0,62	0,38	3
50	105	0,81	0,17	0,00	0,01	0,98	0,02	1
51	107	0,12	0,08	0,79	0,00	0,98	0,02	2
52	110	0,16	0,52	0,00	0,32	0,33	0,67	4
53	114	0,21	0,58	0,00	0,21	0,42	0,58	4
54	115	0,15	0,47	0,00	0,38	0,26	0,74	4
55	123	0,72	0,24	0,00	0,04	0,95	0,05	1
56	125	0,67	0,29	0,00	0,04	0,94	0,06	3
57	126	0,27	0,63	0,00	0,10	0,70	0,30	3
58	127	0,19	0,51	0,00	0,31	0,44	0,56	3
59	129	0,76	0,15	0,08	0,01	0,99	0,01	3
60	130	0,03	0,48	0,00	0,49	0,06	0,94	4
61	132	0,59	0,36	0,01	0,04	0,93	0,07	1
62	134	0,16	0,54	0,00	0,29	0,39	0,61	4
63	135	0,04	0,70	0,00	0,25	0,10	0,90	4
64	137	0,44	0,40	0,00	0,16	0,79	0,21	3
65	140	0,07	0,65	0,00	0,28	0,13	0,87	4
66	143	0,17	0,54	0,00	0,29	0,35	0,65	3
67	144	0,39	0,46	0,00	0,15	0,76	0,24	3
68	146	0,04	0,65	0,00	0,32	0,12	0,88	4

*Kategorizacija (1 – plavolasta, 2 – rdeča, 3 – rjava, 4 – temno rjava/črna). Krepko označene številke predstavljajo nepravilno napoved v primerjavi s subjektivno oceno slike las.

Priloga A3: Verjetnost za posamezno barvo las za vzorce 69 do 100.

Zaporedna številka	Številka vzorca	Barva				Odtotenek		Kategorizacija*
		Svetlolasta	Rjava	Rdeča	Črna	Svetel	Temen	
69	147	0,25	0,62	0,00	0,13	0,62	0,38	3
70	150	0,27	0,63	0,00	0,10	0,77	0,23	3
71	151	0,48	0,40	0,00	0,12	0,85	0,15	1
72	152	0,20	0,52	0,02	0,26	0,45	0,55	3
73	154	0,01	0,39	0,00	0,60	0,01	0,99	4
74	158	0,29	0,60	0,00	0,11	0,77	0,23	3
75	160	0,19	0,51	0,00	0,30	0,44	0,56	4
76	161	0,39	0,33	0,00	0,28	0,73	0,27	1
77	162	0,07	0,37	0,00	0,56	0,15	0,85	4
78	163	0,14	0,72	0,00	0,13	0,49	0,51	4
79	164	0,24	0,48	0,00	0,27	0,51	0,49	3
80	165	0,18	0,61	0,00	0,21	0,44	0,56	3
81	167	0,15	0,46	0,00	0,39	0,34	0,66	3
82	168	0,42	0,42	0,00	0,15	0,76	0,24	3
83	169	0,70	0,27	0,00	0,03	0,95	0,05	1
84	170	0,11	0,72	0,00	0,17	0,34	0,66	4
85	173	0,20	0,48	0,15	0,18	0,45	0,55	4
86	176	0,11	0,44	0,00	0,45	0,20	0,80	4
87	178	0,74	0,22	0,00	0,04	0,95	0,05	1
88	180	0,11	0,57	0,00	0,32	0,28	0,72	1
89	181	0,19	0,51	0,00	0,30	0,44	0,56	3
90	182	0,04	0,36	0,00	0,60	0,10	0,90	3
91	183	0,40	0,41	0,00	0,19	0,74	0,26	3
92	185	0,18	0,34	0,00	0,48	0,38	0,62	4
93	187	0,02	0,43	0,00	0,54	0,03	0,97	4
94	191	0,06	0,38	0,00	0,56	0,13	0,87	4
95	192	0,12	0,47	0,00	0,41	0,31	0,69	4
96	198	0,03	0,53	0,00	0,44	0,09	0,91	4
97	204	0,16	0,46	0,00	0,38	0,34	0,66	4
98	210	0,08	0,67	0,00	0,25	0,23	0,77	4
99	213	0,18	0,46	0,00	0,36	0,41	0,59	4
100	214	0,17	0,47	0,00	0,36	0,37	0,63	4

*Kategorizacija (1 – plavolasta, 2 – rdeča, 3 – rjava, 4 – temno rjava/črna). Krepko označene številke predstavljajo nepravilno napoved v primerjavi s subjektivno oceno slike las.