

A STUDY OF THE DYS390 SYSTEM IN A POPULATION SAMPLE FROM SOUTH-EAST POLAND

Dorota MONIES, Piotr KOZIOŁ, Roman MADRO

Chair and Department of Forensic Medicine, Medical Academy, Lublin

ABSTRACT: Population studies of the DYS390 system were carried out on 186 men from south-east Poland. PCR products, which were fluorescein-labeled by forward primers, were analysed in a denaturing polyacrylamide gel using an FMBIO II (Hitachi). Seven alleles were identified, out of which the most commonly occurring ones are allele 25 (0.489), 24 (0.285) and 23 (0.129). Statistically significant differences have been shown in the frequency of alleles of the DYS390 system between the population under study and four other populations from European countries. A similar distribution of alleles was only found in men from north Poland. The highly informative quality of the DYS390 system was confirmed by coefficients PIC (0.607) and D (0.6590), which were calculated on the basis of the results of the study.

KEY WORDS: DYS390; South-east Poland; Population studies.

Z Zagadnień Nauk Sądowych, z. XLIV, 2000, 99–105

Received 8 May 2000; accepted 31 August 2000

INTRODUCTION

Recently, many microsatellites markers localised on the Y chromosome have been described. They have been applied successfully in phylogenetic and evolution studies as well as in forensic sciences for identification purposes [3, 9]. Introduction of the new STR system to forensic analysis requires knowledge of distribution of its allele in a given population. It seems to be especially important for Y-chromosome STR systems which are characterised by a high degree of heterogeneity [10, 11]. Up to now 10 alleles of DYS390 have been described. The alleles consist of tetranucleotide motif (CTG/AT)_n repeated from 18 to 27 times in the range 191 bp to 227 bp.

MATERIAL AND METHODS

The population studies encompassed 186 unrelated males from south-east Poland. DNA was extracted from blood (blood samples taken from alleged father in disputed paternity cases) with standard phenol-chloroform

extraction method according to Kunkel et al. [4]. PCR reactions were carried out in 25 μ l and consisted of 1ng DNA template, 0.6 U Taq polymerase (PrimeZyme), 200 μ M of each dNTP, 0.5 μ M of each amplification primer DYS390: I – 5' TATATTTTACACATTTTggCC 3' (labelled with fluorescein); II – 5' TgACAgTAAAATgAACACATTgC 3' [3], 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, and 10 mM Tris-HCL pH = 8.3.

PCR products were electrophoretically separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis [6]. Detection of fluorescently labelled PCR product was carried out with a Hitachi FMBIO II. Haplotype analysis of the DYS390 system was performed through comparison of the PCR product to a reamplified (with fluorescent marker) allelic ladder, kindly supplied by Prof. R. Pawłowski (Department of Forensic Medicine, Medical University of Gdańsk). The length of separated DNA fragments was assessed with comparison to internal lane standard CXR 60-400 (Promega Corp.).

Values of polymorphic information content (PIC) and gene diversity – (D) were calculated according to Botstein et al. [1] and Nei [7]. The homogeneity of the DYS390 allele distribution was analysed using χ^2 and G statistic with Carmody's software.

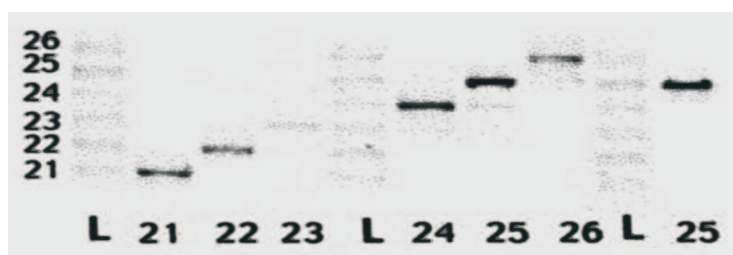


Fig. 1. Electrophoretical pattern of DYS390 alleles. L – ladder; DYS390 alleles from left: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 25.

RESULTS AND DISCUSSION

The technique of electrophoretic separation and detection applied here allows reliable results to be gained from DYS 390 allele genotyping (Figure 1). In the analysed samples collected from male individuals seven alleles of the DYS390 STR system were identified. The frequencies of determined alleles are presented in Table 1. The most frequent was allele 25 ($f = 0.489$) followed by alleles 24 ($f = 0.285$) and 23 ($f = 0.129$). Comparative analysis of population data from south-east Poland with data from other European populations revealed homogeneity with a population sample from northern Poland. However, frequency of allele 25 in our population is significantly higher and frequencies of allele 24 significantly lower than in both compared German population samples and Italian and Spanish populations.

TABLE I. ALLELE FREQUENCY OF *DYS390* LOCUS IN THE POPULATION OF SOUTH-EAST POLAND

Allele	Number of alleles	Frequency of alleles
21	1	0.0054
22	9	0.0484
23	24	0.1290
24	53	0.2849
25	91	0.4893
26	7	0.0376
27	1	0.0054

TABLE II. ALLELE FREQUENCY OF *DYS390* LOCUS IN SIX EUROPEAN POPULATIONS

Population	Alleles									Number of individuals
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
South-east Poland	0.0000	0.0000	0.0054	0.0484	0.1290	0.2849	0.4893	0.0376	0.0054	186
North Poland [8]	0.0040	0.0000	0.0080	0.0800	0.1566	0.2811	0.4297	0.0360	0.0040	249
Germany – Saxony [5]	0.000	0.000	0.008	0.084	0.256	0.328	0.304	0.020	0.00	250
Germany – Bonn [2]	0.000	0.000	0.017	0.219	0.202	0.328	0.227	0.008	0.000	119
Italy [10]	0.00	0.00	0.01	0.06	0.19	0.63	0.11	0.00	0.00	100
Spain [9]	0.0000	0.0000	0.0259	0.0345	0.2672	0.5345	0.1379	0.00	0.00	116

TABLE III. COMPARISON OF *DYS390* LOCUS ALLELE FREQUENCY IN SOUTH-EAST POLAND AND OTHER EUROPEAN POPULATIONS

Populations compared	χ^2	P	G-test	P
South-east Poland x North Poland	3.9279	0.8392	4.3562	0.8606
South-east Poland x Germany (Saxony)	23.3337	0.0004	24.0637	0.0006
South-east Poland x Germany (Bonn)	38.0509	0.0000	39.3580	0.0000
South-east Poland x Italy	51.5935	0.0000	58.5132	0.0000
South-east Poland x Spain	51.6375	0.0000	57.3823	0.0000

TABLE IV. GENE DIVERSITIES (D) OF DYS390 LOCUS IN SIX EUROPEAN POPULATIONS

Population	Gene diversity
South-east Poland	0.6590
North Poland	0.704
Germany (Saxony)	0.7269
Germany (Bonn)	0.7523
Italy	0.5512
Spain	0.6221

Moreover, allele 27, which was identified in both polish population samples, has not appeared in other European populations (Table II and III). For the analysed population values for PIC and D coefficients were calculated, where D is the equivalent of the discrimination index (DI) defining the value of discrimination for autosomal markers [3]. Obtained values of $D = 0.6590$ and $PIC = 0.607$ place the DYS390 STR system among highly informative DNA markers and prove the usefulness of the system for forensic identification. The calculated D value is similar to values of this coefficient calculated for other European populations (Table IV).

References:

1. Botstein D., White R. L., Skolnick M. [et al.], Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism, *American Journal of Human Genetics* 1980, vol. 32, pp. 182–190.
2. Junge A., Madea B., Population studies of the Y-chromosome specific polymorphisms DYS19, DYS389 I + II, DYS390 and DYS393 in a Western German population (Bonn area), *Forensic Science International* 1999, vol. 101, pp. 195–201.
3. Kayser M., Caglia A., Corach D. [et al.], Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 125–133.
4. Künkel L. M., Smith K. D., Boyer S. H. [et al.], Analysis of human Y chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1977, vol. 74, pp. 1245–1249.
5. Lessig R., Edelmann J., Y chromosome polymorphisms and haplotypes in West Saxony (Germany), *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 111, pp. 215–218.
6. Lins A. M., Sprecher C. J., Puers C. [et al.], Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci – silver and fluorescence detection, *Biotechniques* 1996, vol. 20, pp. 882–889.

7. Nei M., Analysis of gene diversity in subdivided populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1973, vol. 70, pp. 3321–3323.
8. Pawłowski R., Branicki W., Kupiec T., Y-Chromosomal polymorphic loci DYS19, DYS390, DYS393 in a population sample from northern Poland, *Electrophoresis* 1999, vol. 20, pp. 1702–1706.
9. Pestoni C., Cal M. L., Lareu M. V. [et al.], Y chromosome STR haplotypes: genetic and sequencing data of the Galician population (NW Spain), *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 112, pp. 15–21.
10. Reference tables [to:] Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study; Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects, *International Journal of Legal Medicine* 1997, vol. 110, pp. 141–149.
11. Rossi E., Rolf B., Schürenkamp M. [et al.], Y-chromosome STR haplotypes in an Italian population sample, *International Journal of Legal Medicine* 1998, vol. 112, pp. 78–81.

BADANIA UKŁADU DYS390 W POPULACJI POLSKI POŁUDNIOWO-WSCHODNIEJ

Dorota MONIES, Piotr KOZIOŁ, Roman MAĐRO

WSTĘP

W ostatnich latach poznano wiele markerów STR zlokalizowanych na chromosomie Y, które okazały się bardzo przydatne do badań ewolucyjnych i genealogicznych oraz do identyfikacji śladów biologicznych [3, 9]. Wdrożenie nowego markera do rutynowych analiz z zakresu genetyki sądowej wymaga jednak uprzedniego poznania częstości występowania jego alleli. W przypadku układów Y-STR uzyskanie własnej bazy częstości alleli jest szczególnie istotne. Markery te są bowiem w wysokim stopniu heterogenne [10, 11], a polimorfizm locus DYS390 zależy od czteronukleotydowego motywu (CTG/AT)_n, który może być powtórzony od 18 do 27 razy, tworząc 10 alleli w zakresie 191–227 pz [3].

MATERIAŁY I METODY

Przebadano 186 próbek DNA. Uzyskano je metodą ekstrakcji fenol – chloroform wg Künkela i in. [4] z krwi pobranej od niespokrewnionych mężczyzn (badanych w związku z procesem spornego ojcostwa), którzy mieszkali na terenie Polski południowo-wschodniej.

Reakcję PCR prowadzono w 15 µl mieszaniny reakcyjnej, która zawierała 1 ng matrycy DNA, 0.6 U Taq polimerazy (PrimeZyme), 200 µM każdego z dNTP, dwa startery locus DYS390: I – 5' TATATTTTACACATTTTggCC 3' (znakowany fluoresceina); II – 5'TgACAgTAAAATgAACACATTgC3' [3] w stężeniu 0,5 µM każdy oraz 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl i 10 mM Tris-HCl o pH = 8,3.

Produkty PCR rozdzielano na denaturujących żelach poliakrylamidowych [6]. Detekcję fluorescencji prowadzono przy użyciu aparatu Hitachi FMBIO II. Haplotypy układu DYS390 ustalano przez porównanie fragmentów PCR ze zreampfikowaną (ze znacznikiem fluorescencyjnym) drabiną alleli, której wzorzec udostępnił dr hab. n. med. Ryszard Pawłowski z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku. Do pomiaru wielkości fragmentów PCR używano standardu wewnętrznego CXR 60-400 (Promega Corp.).

Wartości współczynników informacji o polimorfizmie (ang. polymorphism information content – PIC) i różnorodności genetycznej (ang. gene diversity – D) obliczono wg Botsteina i in. [1] oraz Neia [7]. Analizę homogenności rozkładu alleli przeprowadzono (używając program Carmody'ego) testem χ^2 oraz testem G.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zastosowana technika rozdziału elektroforetycznego i detekcji pozwala uzyskać powtarzalne wyniki fenotypowania alleli układu DYS390 (rycina 1). W przebadanej grupie mężczyzn zidentyfikowano siedem alleli układu DYS390. Częstości tych alleli przedstawia tabela I. Najczęściej stwierdzano allel 25 (0,489), z dużą częstością występowały również allele 24 (0,285) i 23 (0,129).

Porównanie częstości alleli układu DYS390, które stwierdzono w populacji Polski południowo-wschodniej, z częstościami alleli tego układu w innych populacjach europejskich, wykazało homogenność z populacją Polski północnej. Natomiast częstość allele 25 w przebadanej populacji okazała się znacznie wyższa, a częstość allele 24 znacznie niższa niż w obu populacjach niemieckich oraz populacjach Włoch i Hiszpanii. Ponadto allel 27, który zidentyfikowano w obu polskich populacjach, nie wystąpił w żadnej z pozostałych populacji (tabela II i III).

Dla przebadanej populacji obliczono następnie współczynniki PIC oraz D, który jest odpowiednikiem indeksu dyskryminacji (DI) określającego wartość różnicującą markerów zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych [3]. Uzyskano wartości $D = 0,6590$ i $PIC = 0,607$, co potwierdza, że system DYS390 należy do grupy markerów wysoce informatywnych, a więc przydatnych dla potrzeb genetyki sądowej [1]. Otrzymana wartość D jest zbliżona do tych wartości, które uzyskano w innych populacjach europejskich (tabela IV).