

Абрамян И.Р.

Особенности полиморфизма гена калликреина-4 (KLK-4) у монголоидных и европеоидных этнических групп, населяющих Омскую область

ГБОУ «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, кафедра терапевтической стоматологии, г. Омск

Abramyan I.R.

Kallikrein-4 gene polymorphism (KLK-4) features in europeoid and ongoloid ethnic groups inhabiting the Omsk region

Резюме

С целью выявления распространенности мутаций гена калликреин-связанной пептидазы в популяции изучен его аллельный полиморфизм у европеоидных и монголоидных этнических групп, проживающих на территории Омской области. Этническая группа европеоидов представлена русскими, этническая группа монголоидов представлена казахами, так как это две наиболее многочисленные популяции на территории города Омска и Омской области (Западная Сибирь). Молекулярное типирование KLK-4 проводилось гибридизацией однонуклеотидных зондов амплифицированными ДНК, полученными от 76 русских и 74 казахов.

Ключевые слова: амелогенез, калликреин-связанная пептидаза, полиморфизм, этнические группы

Summary

In order to determine the prevalence of mutations of the kallikrein-related peptidase in the population we studied its allelic polymorphism in Europeoid and Mongoloid ethnic groups living in the territory of the Omsk region. An ethnic group is a Russian Europeoid, Mongoloid ethnic group is represented by the Kazakhs, as it is the two largest populations in the Omsk city and the Omsk region (Western Siberia). Molecular typing of KLK-4 was carried out by hybridization of single nucleotide probes amplified DNA derived from 76 Russian and 74 Kazakhs.

Key words: amelogenesis, KLK-4, polymorphism, ethnic groups

Введение

Ген калликреина-4 (KLK-4) находится в 19 хромосоме (19q13). KLK-4 является основным ферментом стадии созревания зубной эмали и отвечает за замещение белковой матрицы на минералы и формирование правильной организации кристаллов [8,12]. Пептидаза KLK-4 является, своего рода, «вакуатором» остаточных фрагментов матричных белков при замене их на минералы [10,14], регулирует обработку органической матрицы эмали, что в конечном итоге определяет структуру и состав эмали [5,9]. Мутации гена KLK-4 приводят к усечению молекулы белка пептидазы, что влияет на протолитическую активность и непосредственно на структуру гидроксиапатита (ГА) [15]. Изменяется ширина или толщина кристаллов ГА, но их длина остается неизменной [3,7]. Причем этот дефект в большей степени проявляется в области эмалево-дентинной границы [4,13]. Внешние слои эмали обладают нормальной твердостью, но внутренние области мягки и содержат намного больше белка, чем в норме. Темп минерализации эмали при дефекте KLK-4 в

целом ниже на 25%. Влияние мутаций гена KLK-4 проявляется в нарушении минерализации кристаллов гидроксиапатита и увеличении остаточного количества белка в эмали [1,5]. По данным литературы [6,11] измененная таким образом эмаль, обладает меньшей устойчивостью к механическим и физическим факторам и подвергается нефизиологическим формам стираемости.

Клиническими исследованиями были установлены существенные различия в активности, распространенности и темпе прироста кариеса у русских и казахов, населяющих Омскую область. В этой связи изучение полиморфизма гена KLK-4 является попыткой обоснования этой разницы с молекулярно-генетических позиций.

Цель исследования - изучение аллельного полиморфизма гена KLK-4 с целью выявления распространенности мутаций в различных этнических группах.

Материалы и методы

Было проведено молекулярно-генетическое обследование исследовательской когорты, состоящей из 150

Таблица 1. Распределение полиморфизмов гена KLK-4 в популяции русских, населяющих Омскую область

Полиморфизм	Аллель	Распространенность аллеля, %	Генотип	Распространенность генотипа, %
Мутация 1 (T2664152G)	T	50,0±4,1	T/T	21,1±3,3
	G	50,0±4,1	T/G	57,9±4,0
			G/G	21,1±3,3
Мутация 2 (G2664153A)	G	52,0±4,1, p<0,05	G/G	19,7±3,2, p<0,01
	A	48,0±4,1	G/A	64,5±3,9
			A/A	15,8±2,9
Мутация 3 (G2142A)	G	69,7±3,7	G/G	47,4±4,1, p<0,001
	A	30,3±3,7	G/A	44,7±4,0
			A/A	7,9±2,2

Таблица 2. Распределение полиморфизмов гена KLK-4 в популяции казахов, населяющих Омскую область

Полиморфизм	Аллель	Распространенность аллеля, %	Генотип	Распространенность генотипа, %
Мутация 1 (T2664152G)	T	41,9±4,1	T/T	20,3±3,3
	G	58,1±4,1	T/G	43,2±4,1
			G/G	36,5±3,9
Мутация 2 (G2664153A)	G	37,9±4,0	G/G	13,5±2,8
	A	62,1±4,0, p<0,05	G/A	48,6±4,1
			A/A	37,8±4,0, p<0,01
Мутация 3 (G2142A)	G	27,7±3,7	G/G	10,8±2,6
	A	72,3±3,7, p<0,001	G/A	33,8±3,9
			A/A	55,4±4,1, p<0,001

человек в возрасте от 25 до 49 лет, из которых русских – 76 человек (39 женщин и 37 мужчин) и казахов – 74 человека (37 женщин и 37 мужчин). Представленная выборка была генотипирована по гену калликреина-4 (KLK4). Ген KLK4 исследовали в трех мутантных точках: T2664152G (мутация 1), G2664153A (мутация 2), G2142A (мутация 3).

Исследование выполнено с использованием образцов ДНК, выделенных из венозной крови обследуемых. После забора 3-4мл цельной венозной крови в вакуумную пробирку производилось выделение ДНК с реактивом "ДНК-экспресс-кровь" (НПО «Литех», г.Москва).

Для определения точечных мутаций использовался метод "SNP-Экспресс", представляющий собой универсальный метод, основанный на единой программе амплификации, а также в формате реакционной смеси со стандартным праймером. ПЦР - набор "SNP-Экспресс" включает в себя две реакционные смеси для идентификации "нормальной" и "патологической" аллели соответственно. Каждая реакционная смесь содержит по паре аллель - специфичных праймеров. Таким образом, каждый образец выделенной ДНК подвергается амплификации дважды - с двумя аллель - специфичными реакционными смесями, что, соответственно, позволяет после

проведения электрофореза давать три типа заключения: "нормальная" гомозигота, гетерозигота, "патологическая" гомозигота.

В пробирку для амплификации мы вносили 20мкл. смеси из разбавителя, реакционной смеси и фермента Taq - полимеразы, добавляли 5 мкл. выделенной ДНК, помещали в амплификатор "Терцик" для проведения ПЦР, затем проводили электрофорез в 3% геле агарозы в течение 30 минут.

Результаты и обсуждение

Частоты полиморфизмов гена KLK4 у обследованного контингента представлены в таблицах 1 и 2.

При анализе генотипов аллельного полиморфизма гена KLK4 среди казахов, в мутационной точке 2 (G2664153A) было зафиксировано статистически значимое (p<0,01) повышение частот генотипов A/A по отношению к генотипам G/G и G/A, а также значимое (p<0,05) преобладание патологического аллеля A у казахов, в то время как у русских была значимо (p<0,01) выше частота генотипа G/G (нормальная гомозигота) и преобладание нормального аллеля G (p<0,05).

В мутационной точке 3 (G2142A) аллельного полиморфизма гена KLK4 у казахов также отмечается стати-

Таблица 3. Результат оценки различий в группах по распространенности аллелей/генотипов (2I – статистика, p)

	Аллели		Генотипы	
	2I	p	2I	p
Мутация 1 (T2664152G)	1,99	>0,05	4,75	>0,05
Мутация 2 (G2664153A)	6,08	<0,05	9,56	<0,01
Мутация 3 (G2142A)	54,72	<0,001	49,88	<0,001

Таблица 4. Распределение полиморфизмов гена KLK-4 среди мужчин обеих этнических групп

Полиморф-ная точка	Национальность	генотип			аллели	
		Нормаль-ные гомозиготы,%	Гетеро-зиготы,%	Патологи-ческие гомозиготы,%	Нормаль-ный,%	Патологи-ческий,%
Мутация 1 (T2664152G)	Русс.	11,8±2,6	25±3,5	11,8±2,6	24,3±3,5	24,3±3,5
	Каз.	8,1±2,2	21,6±3,4	20,3±3,3	18,9±3,2	31,1±3,8
Мутация 2 (G2664153A)	Русс.	17,1±3,1	25±3,5	6,6±2,0	29,6±3,7	19,1±3,2
	Каз.	6,8±2,1	28,4±3,7	14,9±2,9	20,9±3,3	29,1±3,7
Мутация 3 (G2142A)	Русс.	23,7±3,4	18,4±3,1	6,6±2,0	32,9±3,8	15,8±3,0
	Каз.	5,4±1,9	14,9±2,9	29,8±3,8	12,8±2,7	37,2±4,0

Таблица 5. Результат оценки различий в группах по распространенности аллелей/генотипов среди мужчин обеих этнических групп (2I – статистика, p)

Исследовательские точки	Аллели		Генотипы	
	2I	p	2I	p
Мутация 1 (T2664152G)	2,23	>0,05	2,38	>0,05
Мутация 2 (G2664153A)	5,33	<0,05	6,09	<0,05
Мутация 3 (G2142A)	26,94	<0,001	21,55	<0,001

стически более значимое ($p < 0,001$) увеличение не только патологических гомозигот A/A по сравнению с русскими, но и значительное преобладание патологического аллеля A. У русских, напротив, отмечается статистически значимое увеличение полиморфизма G/G (нормальная гомозигота) по сравнению с полиморфизмами G/A и A/A. Результаты статистического анализа представлены в табл.3

При оценке частоты выявления аллелей T и G (мутация 1 T2664152G), величина относительного риска (OR, OP) составила 1,194 (CI95%: 0,932-1,529), величина отношения шансов (ОШ) составила 1,387 (0,879-2,188).

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 2 G2664153A), величина относительного риска (OR, OP) составила 1,374 (CI95%: 1,062-1,776), величина отношения шансов (ОШ) составила 1,778 (1,122-2,816).

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 3 G2142A), величина относительного риска (OR, OP) составила 2,517 (CI95%: 1,902-3,333), величина отношения шансов (ОШ) составила 6,014 (3,65-9,91).

После систематизации обследуемых по половому признаку удалось установить следующее.

При сравнении исследуемых генотипов аллельного полиморфизма гена KLK4 в группах мужчин, удалось

обнаружить статистически значимые различия как по генотипам, так и по аллелям во второй ($p < 0,05$) и третьей ($p < 0,001$) мутантных точках. У мужчин казахов отмечаются значимо большие частоты генотипов A/A (патологические гомозиготы), чем в группе русских мужчин: 14,9% и 6,6%, соответственно для мутации 2(G2664153A) и 29,8% и 6,6% соответственно для мутации 3 (G2142A).

Частота патологического A-аллеля значимо ($p < 0,05$) повышается, а частота нормального G – аллеля имеет статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение в группе мужчин казахов в мутационной точке 2 (G2664153A) аллельного полиморфизма гена KLK4 по сравнению с аналогичным показателем у русских мужчин. В мутационной точке 3 (G2142A) аналогичная закономерность носит еще более выраженный характер ($p < 0,001$). Распределение полиморфизмов гена KLK-4 среди мужчин русских и казахов и результаты статистического анализа представлены в табл.4 и 5.

При оценке частоты выявления аллелей T и G (мутация 1 T2664152G) среди мужчин, величина относительного риска (OR, OP) составила 1,321 (CI95%: 0,912-1,914), величина отношения шансов (ОШ) составила 1,643 (0,854-3,161).

Таблица 6. Распределение полиморфизмов гена KLK-4 среди женщин обеих этнических групп

Полиморф-ная точка	Национальность	генотип			аллели	
		Нормаль-ные гомозиготы,%	Гетеро-зиготы,%	Патологи-ческие гомозиготы,%	Нормаль-ный,%	Патологи-ческий,%
Мутация 1 (T2664152G)	Русс	9,2±2,3	32,9±3,8	9,2±2,3	25,7±3,5	25,7±3,5
	Каз.	12,2±2,7	21,6±3,4	16,2±3,0	23,0±3,5	27,0±3,6
Мутация 2 (G2664153A)	Русс	2,6±1,3	39,5±4,0	9,2±2,3	22,4±3,4	29,0±3,7
	Каз.	6,8±2,1	20,3±3,3	23,0±3,5	16,9±3,1	33,1±3,9
Мутация 3 (G2142A)	Русс	23,7±3,4	26,3±3,6	1,3±0,9	36,8±3,9	14,5±2,9
	Каз.	5,4±1,6	18,9±2,9	25,7±3,6	14,9±2,9	35,1±3,9

Таблица 7. Результат оценки различий в группах по распространенности аллелей/генотипов среди женщин обеих этнических групп (2I – статистика, р)

Исследовательские точки	Аллели		Генотипы	
	2I	р	2I	р
Мутация 1 (T2664152G)	0,25	>0,05	3,52	>0,05
Мутация 2 (G2664153A)	1,54	>0,05	10,67	<0,01
Мутация 3 (G2142A)	27,74	<0,001	30,43	<0,001

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 2 G2664153A) среди мужчин, величина относительного риска (OR, OP) составила 1,452 (CI95%: 1,049-2,009), величина отношения шансов (ОШ) составила 2,152 (1,116-4,15).

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 3 G2142A) среди мужчин, величина относительного риска (OR, OP) составила 2,632 (CI95%: 1,732-3,999), величина отношения шансов (ОШ) составила 6,031 (2,955-12,308).

Среди женщин также отмечаются статистически значимые различия генотипов во второй и третьей полиморфных точках. В мутационной точке 2 (G2664153A) статистически значимо (p<0,05) повышается число патологических гомозигот с генотипом A/A в группе женщин-казашек по сравнению с русскими женщинами (23% и 9,2% соответственно), а при анализе распределения аллелей в данной точке статистически значимых различий не выявлено (p>0,05). В третьей полиморфной точке (G2142A) наблюдается статистически значимое (p<0,001) увеличение как числа патологических гомозигот (A/A – 25,7%), так и числа патологических аллелей (35,1%) в группе женщин-казашек по сравнению с аналогичными показателями у русских женщин (A/A – 1,3%, аллелей A-14,5%). Распределение полиморфизмов гена KLK-4 среди женщин русских и казашек и результаты статистического анализа представлены в таблицах 6 и 7.

При оценке частоты выявления аллелей T и G (мутация 1 T2664152G) среди женщин, величина относительного риска (OR, OP) составила 1,088 (CI95%: 0,781-1,517), величина отношения шансов (ОШ) составила 1,176 (0,622-2,225).

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 2 G2664153A) среди женщин, величина относительного риска (OR, OP) составила 1,29 (CI95%: 0,859-2,923),

величина отношения шансов (ОШ) составила 1,515 (0,785-2,923).

При оценке частоты выявления аллелей G и A (мутация 3 G2142A) среди женщин, величина относительного риска (OR, OP) составила 2,415 (CI95%: 1,057-3,520), величина отношения шансов (ОШ) составила 6,017 (2,984-12,131).

При анализе таблиц сопряженности оценивались значения информационной статистики Кульбака (2I – статистика) (для оценки связи изучаемых факторов и результативных признаков), которая рассматривается как мощный вариант непараметрического дисперсионного анализа, применяемый, в т.ч. и на относительно малых выборках [2].

Вычисление информационной статистики Кульбака для таблицы с двумя входами осуществлялось по следующей формуле:

$$2I = \left(\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c 2n_{ij} \ln n_{ij} + 2n \ln n \right) - \left(\sum_{i=1}^r 2n_{i.} \ln n_{i.} + \sum_{j=1}^c 2n_{.j} \ln n_{.j} \right),$$

или: 2I = (сумма 1) – (сумма 2), где 2I – показатель информационной статистики; ni и nj – объемы выборок в двух альтернативных группах.

Полученное фактическое значение 2I сравнивали с табличным значением χ^2 – квадрат при соответствующем числе степеней свободы.

Результаты исследования свидетельствуют об информативности полиморфизма гена KLK4 в мутационных точках G2664153A и G2142A.

Частоты аллеля A гена KLK4 и генотипов A/A в популяции казахов близки к описанным в литературе [13]. Отсутствие прямой связи между частотой генотипа A/A и заболеваемостью карнесом в разных популяции рус-

ских и казахов позволяет предполагать, что реализация патогенного потенциала аллеля А зависит от внешних факторов. Нельзя также исключать и возможность влияния других компонентов генома, сцепленных или несцепленных с геномом G2664153A и G2142A. Присутствие аллеля А, по-видимому, следует рассматривать как необходимый, но недостаточный фактор для развития кариеса. В этом контексте можно объяснить отсутствие менделевского наследования этого заболевания.

Причины большей представленности в выборках больных полиморфизмов А/А по сравнению с полиморфизмами G/G и G/A требует дальнейшего изучения. При дальнейшем подтверждении полученного результата можно будет констатировать, что найден один из главных генов наследственной предрасположенности для такого распространённого мультифакториального стоматологического заболевания, как кариес.

Выводы

В изученных группах пациентов достоверно более частое носительство патологических аллелей у

казахов, по сравнению с русскими. Выявленные особенности позволяют сделать вывод о нарушении процесса амелогенеза у представителей монголоидной этнической группы, что непосредственно отражается на микроструктуре эмали, а также влияет на особенности течения кариозного процесса и предрасположенность к данному заболеванию. Более детальное дальнейшее изучение структуры и текстуры эмали позволит определить степень выраженности дефектности кристаллов гидроксипапатита и установить взаимосвязь с особенностями течения кариеса. ■

Абрамян И.Р. - аспирант кафедры терапевтической стоматологии ГБОУ «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г.Омск, врач-стоматолог-терапевт. Адрес для переписки: 644030 г.Омск, ул.Омская д.149 кв.74, тел. 8-965-985-8477, e-mail: Iren.Khrishpens@gmail.com

Литература:

1. Вавилова Т.П. Биохимия тканей и жидкостей полости рта / Т.П. Вавилова. - М., 2008. - 208 с.
2. Закс Л. Статистическое оценивание / Л. Закс. - М.: Статистика, 1976. — 598 с.
3. Bei M. Molecular genetics of tooth development. *Curr Opin Genet Dev.* 2009 Oct;19(5):504-10.
4. Charles E.Smith, Yuanyuan Hu, Amelia S.Richardson, John D. Bartlett, Jan C-C. Hu, James P. Simmer. Relationships between protein and mineral during enamel development in normal and genetically altered mice. *Eur J Oral Sci.* 2011 December; 119(Suppl 1): 125-135.
5. Chun Y.-H.P., Y. Yamakoshi, F. Yamakoshi, M. Fukae, J.C.-C. Hu, J.D. Bartlett, J.P. Simmer. Cleavage Site Specificity of MMP-20 for Secretory-stage Ameloblastin. *J Dent Res.* 2010 August; 89(8): 785-790.
6. Lacruz RS, Smith CE, Kurtz I, Hubbard MJ, Paine ML. New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts. *J Dent Res.* 2013 Feb;92(2):122-9.
7. Nagano T, Kakegawa A., Yamakoshi, Y. Tsuchiya S., Hu J.C.-C., Gomi, K., Arai T., Bartlett J.D, and Simmer J.P. Mmp-20 and Klk4 Cleavage Site Preferences for Amelogenin Sequences. - *J. Dent Res.* 2009 September; 88(9): 823-828.
8. Simmer, J.P., Papagerakis, P., Smith, C.E., Fisher, D.C., Rountrey, A.N, Zheng, L. and Hu J.C.-C. Regulation of Dental Enamel Shape and Hardness. - *J Dent Res.* 2010 October; 89(10): 1024-1038.
9. Smith CE, Richardson AS, Hu Y, Bartlett JD, Hu JC, Simmer JP. Effect of kallikrein 4 loss on enamel mineralization: comparison with mice lacking matrix metalloproteinase 20. - *J. Biol Chem.* 2011 May 20; 286(20):18149-60.
10. Smith, C.E., Wazen, R., Hu, Y., Zalzal, S.F., Nanci, A., Simmer, J.P., Hu J.C.
11. Consequences for enamel development and mineralization resulting from loss of function of ameloblastin or enamelin. - *Eur J Oral Sci.* 2009 October; 117(5): 485-497.
12. Tye C.E., Pham C.T., Simmer J.P., Bartlett J.D. DPPI May Activate KLK4 during Enamel Formation - *J. Dent Res.* 2009 April; 88(4): 323-327.
13. Yuhe Lu, DDS, Petros Papagerakis, BDS, PhD, Yasuo Yamakoshi, PhD, Jan C-C. Hu, BDS, Ph.D, John D. Bartlett, Ph.D., 3 and James P. Simmer. - Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. - *Biol Chem.* 2008 June; 389(6): 695-700.
14. Wright JT, Daly B, Simmons D, Hong S, Hart SP, Hart TC, Atsawasuwan P, Yamauchi M. Human enamel phenotype associated with amelogenesis imperfecta and a kallikrein-4 (g2142G>A) proteinase mutation. *Eur J Oral Sci.* 2006 May. 114 Suppl 1:13-7; discussion 39-41, 379.
15. Wright J. T., Thomas C. Hartb P. Suzanne Hart, Darrin Simmons, Cynthia Suggs, Bill Daley, Jim Simmer, Jan Hu, John D. Bartlett, Yong Li, Zhi-An Yuan, W. Kim Seow, and Carolyn W. Gibson. Human and Mouse Enamel Phenotypes Resulting from Mutation or Altered Expression of AMEL, ENAM, MMP20 and KLK4. *Cells Tissues Organs.* 2008 December; 189(1-4): 224-229. Published online 2008 August 19.