

ОСОБЕННОСТИ СТАБИЛИЗАЦИИ БЕЛКА P53 В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ АТАКСИЕЙ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИЕЙ ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ

© И. М. Спивак,¹ Н. В. Смирнова,¹ Н. М. Плескач,¹ Т. А. Ледащева,² В. М. Михельсон¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Городской консультативно-диагностический медико-генетический центр, Санкт-Петербург;
электронный адрес: irina_spivak@hotmail.com

Проведено исследование стабилизация белка P53 в клетках, полученных от больных с тяжелым наследственным заболеванием атаксией-телеангиэктазией (АТ), характеризующихся резко повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации и нарушением контроля клеточного цикла после повреждения ДНК. Степень выраженности этих реакций у больных может быть различной, что часто, хотя и не всегда, сопряжено с тяжестью протекания заболевания. Во всех изученных штаммах клеток АТ, как выделенных самостоятельно, так и полученных от зарубежных коллег, после действия ионизирующей радиации в сублетальной дозе наблюдается изменение времени и характера стабилизации белка P53 по сравнению с клетками здорового донора.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, P53, ионизирующая радиация.

Клеточный ответ на повреждение ДНК является краеугольным камнем всей системы поддержания стабильности генома и в первую очередь включает в себя передачу информации о повреждении по множеству сигнальных путей (Kaufmann, 1995; Christmann et al., 2003; Iliakis et al., 2003). Процесс передачи сигнала и участвующие в нем белки формально разделяются на сенсоры, переносчики и эффекторы. Сенсоры прямо или опосредованно распознают повреждения ДНК, служат сигналом этих нарушений и инициируют каскад биохимических реакций. Переносчиками обычно являются протеинкиназы, которые изменяют и усиливают сигнал о повреждениях от сенсоров, фосфорилируя другие киназы или нижележащие белки-мишени. Эффекторные белки включают в себя самые последние нижележащие мишени протеинкиназ переносчиков сигнала. Эффекторный уровень чекпойнта, активирующегося повреждением ДНК, пересекается с машиной клеточного цикла. Одними из самых критичных для клеточной выживаемости повреждениями ДНК являются двухнитевые разрывы (Maser, DePinho, 2002; Norbury, Valerie, Povirk, 2003; Zhivotovsky, 2004), возникающие под действием ионизирующей радиации и мутагенов — гаммамиметиков, к которым, например, относятся эпоксиды (Kolman et al., 1997). Переносчиком сигнала на начальном этапе клеточного ответа на появление двухнитевых разрывов ДНК является протеинкиназа ATM (ataxia-telangiectasia mutant), которая, действуя с самых первых минут после повреждения, фосфорилирует целый спектр белков-мишеней и запускает таким образом сразу несколько различных сигнальных путей. Преимущественная активация того или иного пути и приводит к различному протеканию репарационных процессов в клетке (Lehmann, 2002; Nakoyma, 2002; Iliakis et al., 2003; Shiloh, 2003; Va-

lerie, Povirk, 2003). Пик ATM-зависимого ответа наступает через 0.5 ч после действия повреждающего агента. До сих пор не совсем ясно, каким образом активируется сама ATM, обычно находящаяся в клетке в неактивной гомодимерной форме. При появлении двухнитевых разрывов ДНК две молекулы ATM взаимно фосфорилируются и гомодимер распадается на две активные протеинкиназы. Неясно до конца, каким именно образом гомодимер ATM воспринимает сигнал о повреждении ДНК. Вероятно, она связывается с образующими своеобразные «строительные леса» на поврежденной ДНК белками системы репарации неспаренных оснований MSH2 и MSH6 и, может быть, с ДНК в районе DSB но, вероятнее всего, прямого взаимодействия ATM с ДНК нет (Brown et al., 2003). Она фосфорилирует гистон H2AX, что привлекает белки BRCA1 и NBS1 (являющийся частью комплекса MRN и прямой мишенью ATM, т. е. главным переносчиком сигнала с ATM на MRE), которые ATM также фосфорилирует. По современным представлениям, основными белками — сенсорами повреждений — являются именно комплекс MRE11—RAD50—NBS1 и BRCA1, которые участвуют в распознавании двухнитевых разрывов ДНК. BRCA1 взаимодействует с большим числом белков, вовлеченных в процессы репарации ДНК, и служит якорем и координатором для дальнейшей сборки специального белкового комплекса BASC, участвующего в инициации и передаче сигнала (BASC—BRCA1 — associated genome surveillance complex), и, вероятно, одновременно является адаптором, представляющим дополнительные мишени для фосфорилирования киназам — переносчикам сигнала. Каковы основные функции BRCA1 — сенсорные или медиаторные — до сих пор неясно.

Белки, называемые медиаторами, прототипом которых является дрожжевой RAD9, участвуют в передаче

сигнала. Они содержат два повторяющихся домена, обнаруженных в С-конце белка BRCA1 и названных поэтому BRCT-доменами. BRCT-содержащие белки найдены у млекопитающих, но имеют функции, сходные с дрожжевым RAD9. Среди подобных белков описаны сам BRCA1, TopBP1 (topoisomerase II binding protein I), 53BP1 (P53 binding protein I) и DMCI (mediator of DNA damage checkpoint protein I). Все эти белки вовлечены в чекпойнт-ответ, они распознают повреждения ДНК и привлекают другие белки, которые облегчают передачу сигнала вниз по сигнальному пути и репарацию ДНК (Powell, Kachnic, 2003; Zhou, Bartek, 2004).

Кроме ATM в передаче сигнала участвует и другая протеинкиназа из семейства PI3-киназ (фосфоинозитол-3-киназы) — ATR (ataxia-telangiectasia related), сходная с ней по структуре и хуже изученная, так как нокаутные по этому гену мыши гибнут в эмбриогенезе. Только в 2003 г. было показано, что нарушение репарации ДНК у больных с синдромом Секеля, характеризующимся повышенной чувствительностью к ионизирующей радиации, связано с мутацией, инактивирующей ген ATR (O'Driscoll et al., 2003). ATR включается несколько позднее, пик ее активности наступает через 2—4 ч после повреждения ДНК. В отсутствие ATM ATR частично берет на себя ее функции. Недавно показано, что ATR образует гетеродимер со специфическим белком ATRIP (ATR interacting protein), что важно для чекпойнт-сигнала, хотя механизм этого влияния остается неизвестным. По имеющимся данным, именно ATM определяет ранний чекпойнт-ответ (Kim, Kastan, 2002), а ATR действует позднее, когда уже идет репарация ДНК, поврежденной как ионизирующей радиацией, так и ультрафиолетовым излучением или остановкой вилочек репликации.

В последнее время стало понятно, что ответ клетки на повреждение ДНК зависит от того, в какой фазе клеточного цикла клетка эти повреждения получает. При изучении взаимодействия ATM и P53 в первую очередь следует обратить внимание на клетки, облученные в фазе G₁ (Piakis et al., 2003). Это связано с тем, что P53 является прямой мишенью ATM, фосфорилирующей его по серину в 15-м положении, что приводит к высвобождению P53 из комплекса с MDM2 (который ATM также фосфорилирует по серину в положении 395), его стабилизации и накоплению в ядре и активации как транскрипционного фактора. Благодаря стабилизации белка P53 и его последующей — относительно более медленной — работе как фактора транскрипции, включающего синтез соответствующих белков, например P21, в клетке генерируется длительный и глубокий G₁-арест, опосредуемый инактивацией комплекса циклин E—CDK2 (Комарова, Гудков, 2000; Чумаков, 2000). Вероятно, именно и только P21 является мишенью P53, важной для G₁-чекпойнта, активирующегося при повреждении ДНК. Последующая активация транскрипции MDM2, опосредованная тем же P53, является дополнительным путем регуляции активности P53 (Fei, El-Deiry, 2003; Huang et al., 2003).

Хотя бытует представление о том, что чекпойнты, активирующиеся после повреждения ДНК, нужны для репарации, нет никаких данных о том, что G₁-чекпойнт как-либо способствует репарации двухнитевых разрывов. Вероятнее всего, роль G₁-чекпойнта в поддержании клеточной стабильности состоит в том, что путем P53-опосредованного апоптоза клетки, содержащие ДНК-повреждения, просто элиминируются. При облучении кле-

ток во всех других фазах клеточного цикла P53 также фосфорилируется ATM и быстро стабилизируется, но не работает как транскрипционный фактор, а в первую очередь включается в различные белок-белковые взаимодействия и принимает участие в процессах репарации ДНК, например в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов, спаренной с транскрипцией (Wang et al., 1995; Christmann et al., 2003; Fei, El-Deiry, 2003; Piakis et al., 2003).

Мутации в гене, кодирующем белок ATM (к настоящему времени их описано более 80), приводят к возникновению тяжелого наследственного заболевания атаксии-телеангиэктазии (АТ) или синдрома Луи—Бар (Savitsky et al., 1995; Sandoval et al., 1999). Это заболевание очень подробно описано, является одним из «синдромов нестабильности генома» и характеризуется врожденным иммунодефицитом, нейродегенеративными изменениями, повышенной чувствительностью к ионизирующему излучению, резко повышенной предрасположенностью к опухолевым заболеваниям и ускоренным старением (Лазовский, 1971; Михельсон, 1979; Arlett et al., 1985; Taylor, 1992; Taylor et al., 1996; Спивак, 1999; Concannon, 2002; Pulverer, 2003).

Традиционно сложилось представление о том, что повышенная чувствительность АТ-клеток к радиации является прямым результатом дефекта репарации ДНК от повреждений, вызываемых ионизирующей радиацией. Это было самым распространенным объяснением этиологии данного заболевания. Но многочисленные исследования не обнаружили достоверного изменения кинетики ликвидации как одно-, так и двухнитевых разрывов ДНК в клетках больных АТ по сравнению со здоровыми донорами после облучения (Shiloh et al., 1987; Shiloh, 2003). При этом у большинства, если не у всех изученных штаммов клеток АТ имеет место сниженный и растянутый во времени репаративный синтез ДНК после действия ионизирующей радиации (Михельсон, 1979; Arlett et al., 1985; Спивак, 1999). Несмотря на имеющиеся к настоящему времени многочисленные данные о роли белка ATM в клеточном ответе на радиационные повреждения, остается недостаточно ясной картина в каждом отдельном случае, с которым сталкиваются клиницисты и ученые. Разнообразие реакций и степень их выраженности в клетках отдельных штаммов крайне велики. В предыдущих работах мы изучали стабилизацию белка P53 (Смирнова и др., 1999) в клетках штамма AT2SP и особенности репарации (Хомасуридзе и др., 1999) после гамма-облучения в клетках AT1SP и AT2SP. В настоящей работе нам представляется интересным сравнить полученные нами ранее данные по стабилизации белка P53 в клетках AT2SP с P53-статусом других имеющихся в нашем распоряжении штаммов АТ после гамма-облучения: это любезно предоставленные нам английскими коллегами клетки AT4BI, AT1BR, AT6BR и не исследованные нами ранее AT1SP.

Материал и методика

Клеточные культуры. В работе были использованы как стабильные клеточные линии, так и штаммы диплоидных фибробластов, полученные от различных больных АТ и здорового донора.

Клеточный штамм VH-10 — диплоидные фибробласты крайней плоти мальчика 11 лет, используемые в исследо-

вании в качестве клеток здорового донора (Kolman et al., 1992; Nygren et al., 1994); предоставлены проф. Адой Кольман (Ada Kolman, Стокгольмский университет, Швеция).

Клетки больных АТ: клетки АТ2SP — штамм диплоидных фибробластов мальчика 4 лет, больного АТ (первичные культуры фибробластов кожи получали из биопсий кожи предплечья); клетки АТ1SP — штамм диплоидных фибробластов девочки 6 лет, больной АТ (первичные культуры фибробластов кожи получали из биопсий кожи предплечья); клетки АТ6BR, АТ5BR (Брайтон, Великобритания) и АТ4ВІ (Бирмингем, Великобритания) получены от больных АТ из Великобритании и любезно предоставлены нам проф. Аланом Леманом (Alan Lehman, Траффорд-центр Университета графства Сассекс, Великобритания).

Клеточная линия А431 — клетки эпидермальной карциномы человека, характеризующиеся стабильной гиперэкспрессией белка P53, использована в качестве положительного контроля для подтверждения чувствительности первых антител, применяемых при иммунофлуоресцентном исследовании; получена из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Клетки выращивали в пластиковых флаконах, на чашках Петри (Nunclon, США) и на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри, на среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 12 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) при 37 °С в атмосфере CO₂.

Имунофлуоресцентный анализ P53 проводили на фиксированных клетках. Выращенные на покровных стеклах до субконфлюентного состояния клетки фиксировали 4 %-ным раствором формальдегида в PBS на льду в течение 10 мин. После интенсивной промывки PBS клетки пермеабилizировали в 0.5%-ном растворе Тритона X-100 (Sigma) в PBS в течение 5 мин. Затем клетки промывали PBS и помещали на 30 мин в 1 %-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA; Sigma) в PBS. Для визуализации дикого типа и большинства мутантных форм белка P53 методом непрямой иммунофлуоресценции клетки сначала в течение 60 мин инкубировали с коммерческими поликлональными кроличьими антителами к человеческому белку P53 (1 : 50; Santa Cruz, США), затем — 30 мин с козыми антителами к кроличьему гамма-глобулину, сконъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, Sigma), в разведении 1 : 300. Между инкубациями с антителами стекла промывали 30 мин в 0.1%-ном растворе Tween-20 (Sigma) в PBS.

После окрашивания препараты заключали в раствор пропилгаллата в 90%-ном глицерине, препятствующем выгоранию флуоресценции.

Микроскопия и анализ изображений. Анализ фиксированных на предметных стеклах клеток производили при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 5 Pascal (C. Zeiss, Германия), оборудованного объективом 63/1.4 и аргоновым лазером (458/488 нм).

Облучение проводили на установке ЛМБ-γ-1.

Результаты

Данные непрямого иммунофлуоресцентного анализа приводятся на рис. 1—6. Рисунки, свидетельствующие о постоянном высоком уровне P53 как в ядрах, так и

в цитоплазме клеток А431, здесь не приводятся — они были представлены нами ранее (Смирнова и др., 1999).

В ядрах интактных клеток как у здорового донора, так и у больных АТ не наблюдалось специфического свечения, указывающего на наличие белка P53 (рис. 1, а; 2, а; 3, а; 4, а; 5, а; 6, а). Это хорошо согласуется с представлениями о том, что белок P53 в неповрежденных клетках содержится в ядре в малых количествах, не детектируемых методом непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания, и постоянно переходит из ядра в цитоплазму, где подвергается протеолизу. При этом во всех клетках видна собственная зеленоватая флуоресценция, ярче выраженная в ядрах, чем в цитоплазме.

После облучения в дозе 5 Гр в ядрах клеток здорового донора VH-10 уже через 30 мин выявляется яркое специфическое зеленое свечение, соответствующее появлению детектируемых данным методом количеств белка P53 (рис. 1, б). Это свидетельствует о стабилизации белка P53 в ядре клетки и показывает, что он активно вовлечен в клеточный ответ на повреждение ДНК.

В течение 30 мин после γ-облучения в ядрах клеток всех изученных штаммов больных АТ (кроме АТ1SP) не появлялось специфического свечения, т. е. отсутствовали детектируемые этим методом количества белка P53 (рис. 2, б; 3, б; 4, б; 5, б). При этом явления, наблюдаемые в клетках разных больных, могли существенно отличаться друг от друга: в клетках АТ2SP, АТ5BR и АТ6BR картина полностью соответствовала необлученному контролю (рис. 2, б; 3, б; 5, б), а в клетках АТ4ВІ (рис. 4, б) через 0.5 ч после облучения мы наблюдали яркое специфическое свечение в цитоплазме. Для контроля мы использовали окрашивание антителами к белку теплового шока Hsh70, который также индуцируется в клетках после облучения, при этом в клетках через 0.5 ч после облучения наблюдалось яркое, специфическое окрашивание Hsh70 как в ядре, так и в цитоплазме, т. е. клетки АТ способны неспецифически реагировать на стресс, так же как и клетки здорового донора (рис. 5, д). Дальнейшее наблюдение за облученными клетками показывает, что через 1 ч после облучения в клетках АТ2SP появляется специфическое ядерное свечение, свидетельствующее о наличии там детектируемых количеств белка P53 (рис. 5, в). При этом оно выражено слабее, чем в контрольных клетках VH-10 через 0.5 ч, и активно перемещается в цитоплазму. В линиях АТ5BR и АТ6BR эта тенденция выражена еще ярче — при наличии яркого специфического свечения в цитоплазме в ядрах мы наблюдаем только отдельные светящиеся зерна (рис. 2, в; 3, в). В клетках АТ4ВІ картина через 1 ч не меняется и сохраняется такой же, как и через 0.5 ч после γ-облучения (рис. 4, в). Несколько отличается картина в клетках АТ1SP: здесь специфическое свечение наблюдается уже через 0.5 ч после облучения, как и в контрольных клетках VH-10; через 1 ч картина также соответствует контролю (рис. 6, б, в). Различия появляются при продолжении наблюдения. В контрольных клетках VH-10 уже через 1.5 ч после облучения в дозе 5 Гр начинается возвращение к интактному состоянию (рис. 1, з), а в клетках АТ1SP свечение остается на том же уровне, что и через 1 ч после облучения (рис. 5, з). В клетках АТ2SP, АТ5BR, АТ6BR и АТ4ВІ через 1.5 ч также сохраняется специфическое свечение, может быть, несколько менее интенсивное и гораздо сильнее выраженное в цитоплазме, чем через

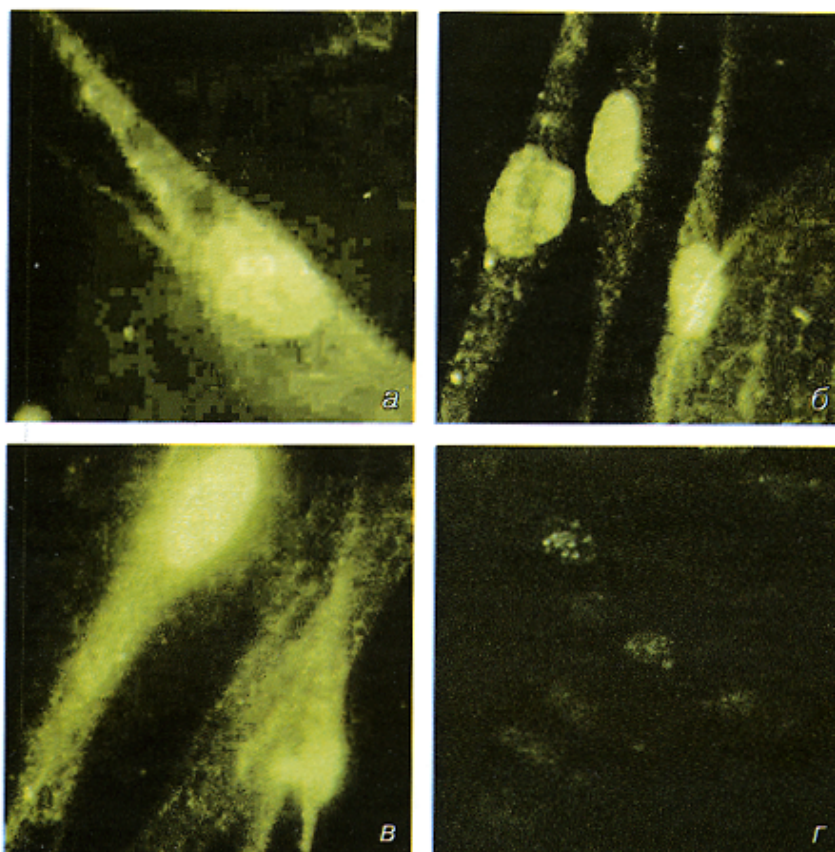


Рис. 1. Фибробласты VN-10, окрашенные антителами к P53.
a — интактные клетки, *б* — через 0.5 ч, *в* — через 1 ч, *г* — через 1.5 ч после облучения в дозе 5 Гр.

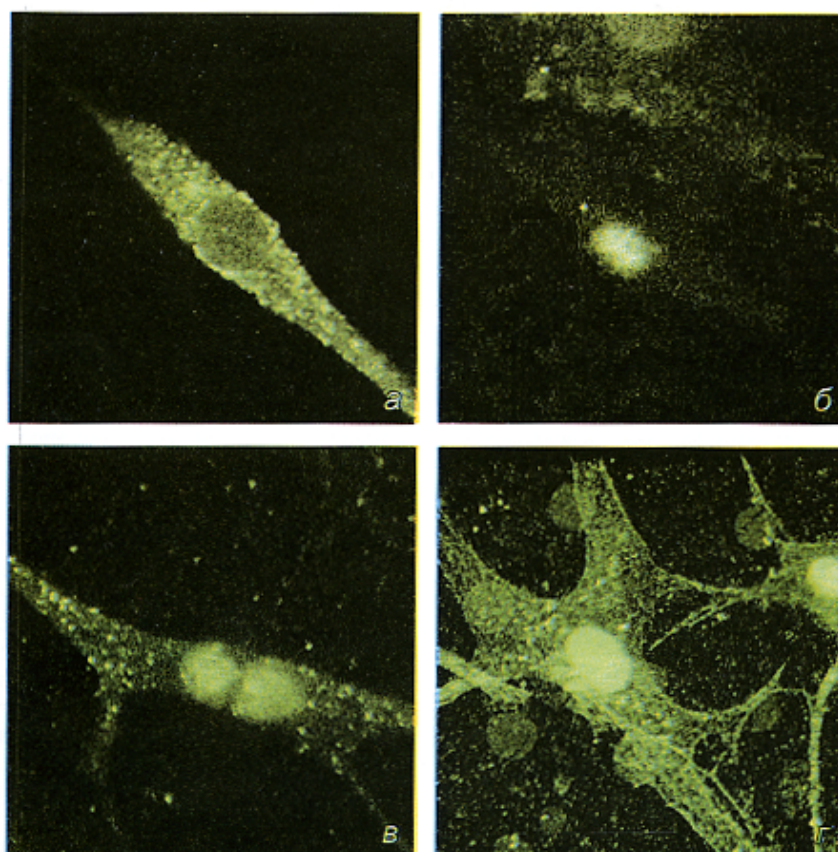


Рис. 2. Фибробласты AT6BR, окрашенные антителами к P53.
 Обозначения те же, что и на рис. 1.

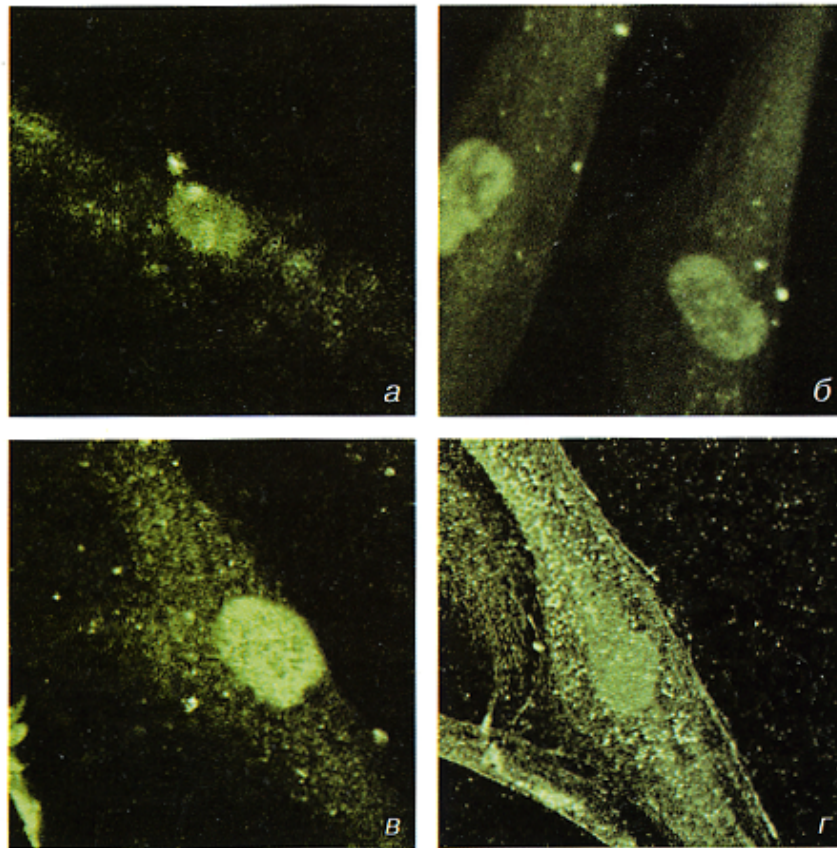


Рис. 3. Фибробласты AT5BR, окрашенные антителами к P53.
Обозначения те же, что и на рис. 1.

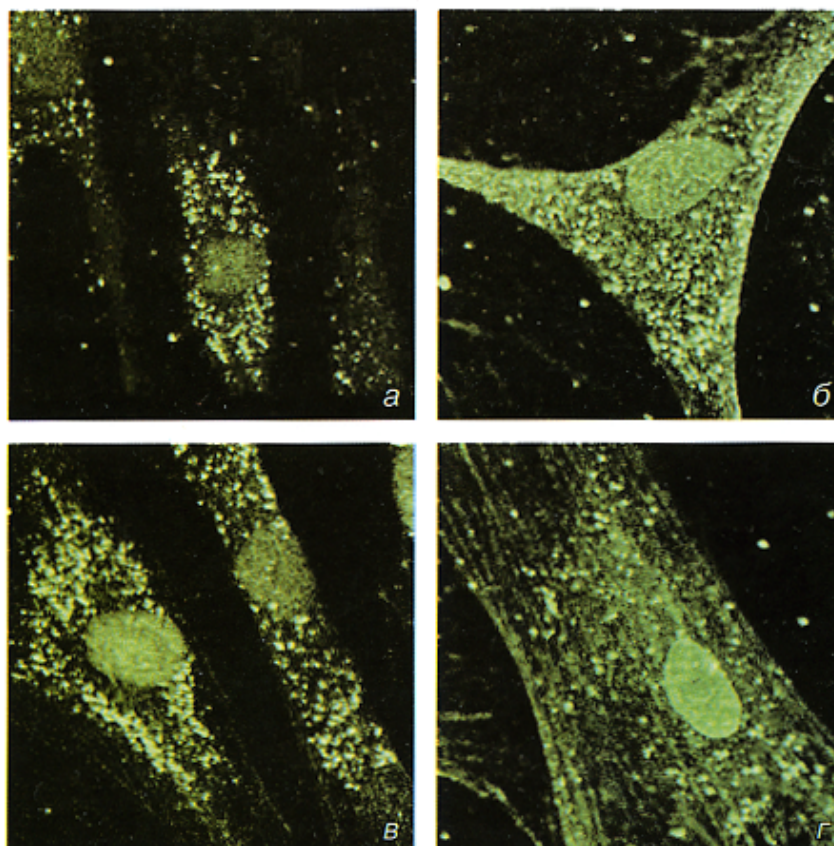


Рис. 4. Фибробласты AT4VI, окрашенные антителами к P53.
Обозначения те же, что и на рис. 1.

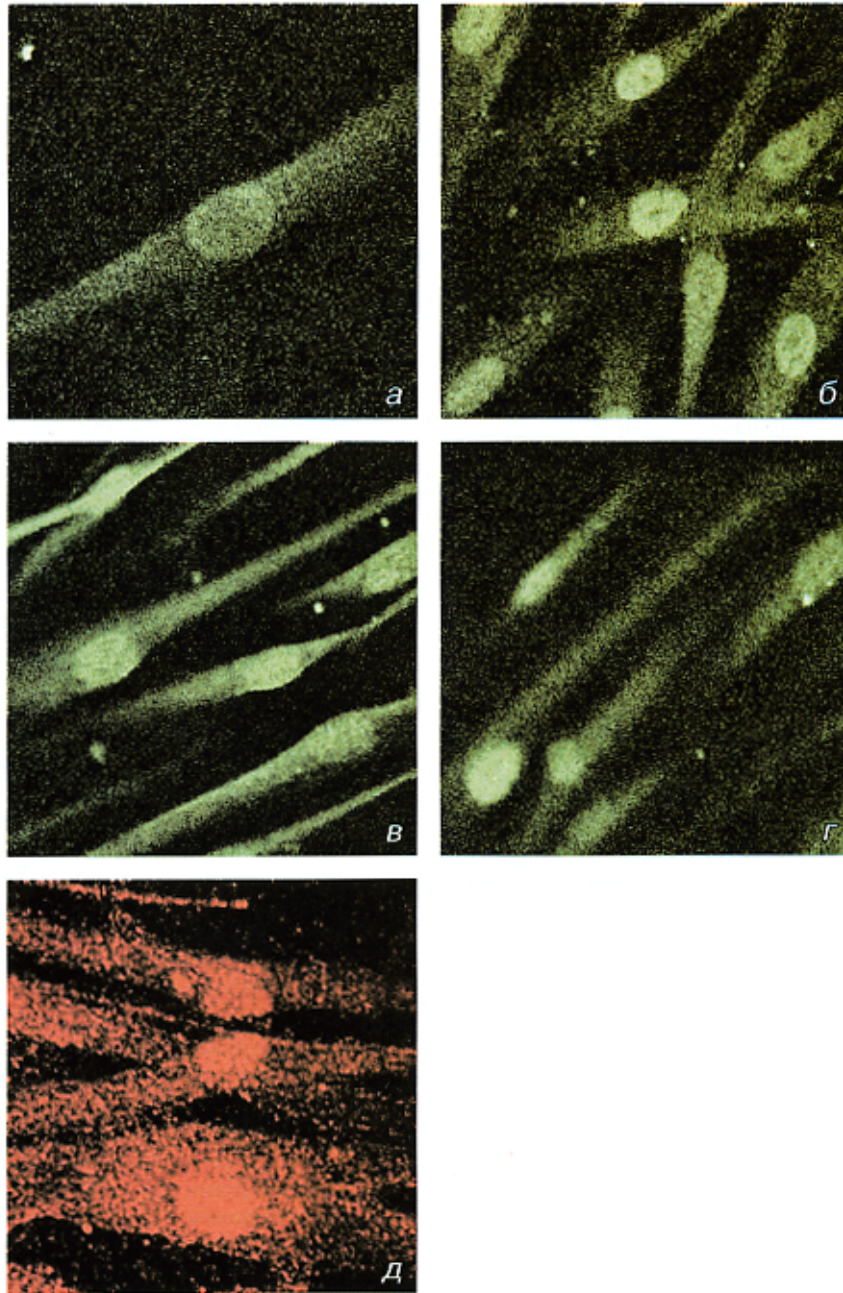


Рис. 5. Фибробласты AT2SP, окрашенные антителами к P53 (а—д) и антителами к HSp70.
 д — клетки через 0.5 ч после облучения; окраска антителами к HSp70.
 Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

1 ч после облучения (рис. 2, з; 3, з; 5, з). Таким образом, мы наблюдаем два основных различия во времени как появления, так и исчезновения детектируемого уровня P53 в исследуемых клетках. Это свидетельствует о том, что почти во всех клеточных линиях АТ (кроме вариантной формы AT1SP) стабилизация P53 в ядрах клеток достоверно запаздывает не менее чем на 0.5 ч по сравнению с контролем. В то же время во всех без исключения исследованных линиях детектируемое количество P53 в ядрах сохраняется дольше. Эти особенности стабилизации белка P53 могут быть использованы как дополнительные характеристики, позволяющие в сложных случаях уточнять диагноз АТ.

Обсуждение

Ген АТМ картирован в 11q23 и кодирует белок с мол. массой 350.6 кДа, содержащий 66 экзонов (Savitsky et al., 1995). Это открытие подтвердило наличие только одного гена АТМ и показало, что описанные ранее различные группы комплементации АТ являются артефактом и свидетельствуют только о большом индивидуальном разнообразии данного заболевания на клеточном уровне. К настоящему времени обнаружено около 80 мутаций, приводящих к инактивации гена АТМ и развитию АТ, и несколько меньшее число характерных для различных популяций полиморфизмов, не влияющих на актив-

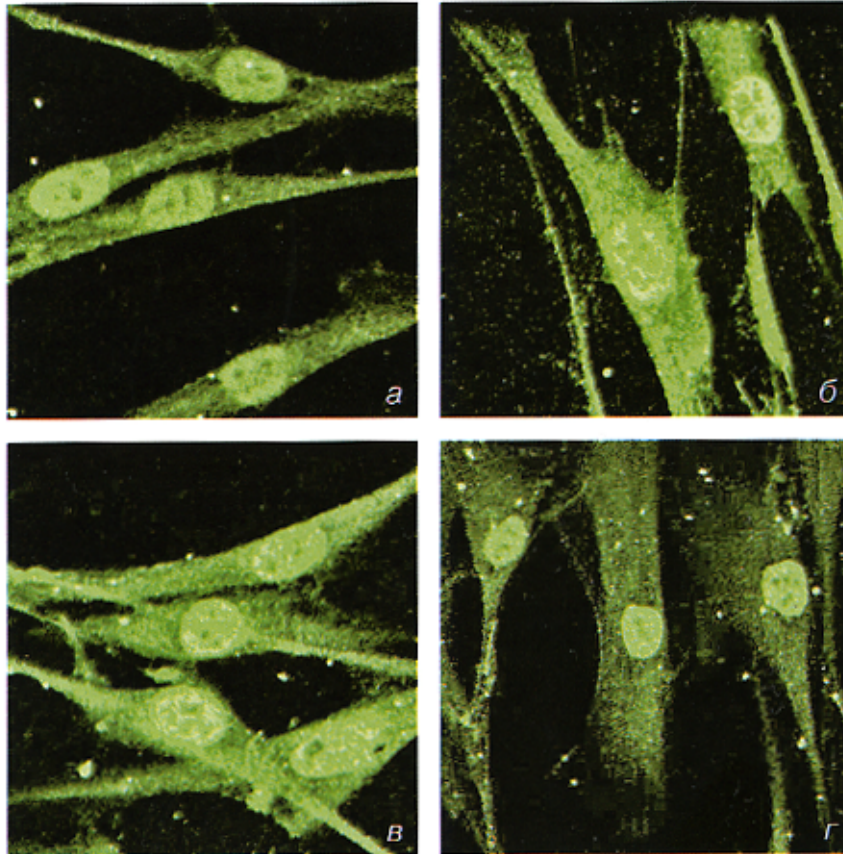


Рис. 6. Фибробласты AT1SP, окрашенные антителами к P53.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

ность белка ATM (Sandoval et al., 1999). Таким образом, к настоящему времени сложилось представление о том, что высокая вариабельность степени выраженности различных клинических признаков АТ все же основана на мутациях в одном гене, продукт которого вовлечен во множество белок-белковых взаимодействий. Именно от этих взаимодействий и зависят характер и тяжесть заболевания в каждом конкретном случае.

Ранее многими авторами была описана особая группа больных АТ, получившая название АТ-вариант, в которой при явных клинических признаках заболевания чувствительность клеток к ионизирующей радиации была выражена достаточно слабо, при этом и сами клинические симптомы заболевания были мягче. В некоторых штаммах клетки могли сохранять характерную для АТ чувствительность к ионизирующей радиации по критерию выживаемости фибробластов и при этом имели резко сниженную чувствительность по критерию хромосомных aberrаций в лимфоцитах. В других случаях была описана и более высокая по сравнению с классической формой АТ выживаемость фибробластов после действия ионизирующей радиации (Taylor et al., 1996). Два брата из одной английской семьи с ярко выраженными симптомами АТ имели хотя и сниженную по сравнению с контролем, но на порядок более высокую выживаемость клеток, чем в случаях обычных больных АТ. Причем одна и та же мутация (выпадение 3 аминокислотных остатков в положении 1198—1200) наблюдалась у этих sibсов AT1ABR и AT2ABR (ранее относимых к группе комплементации D) и больного AT2BR, ранее относимо-

го к группе комплементации С и имевшего крайне высокую чувствительность к γ -облучению (Savitsky et al., 1995). Можно предположить, что более низкая по сравнению с обычной для АТ чувствительность клеток АТ-варианта к облучению связана с какими-то эпигенетическими процессами в клетках конкретных больных, а не с определенными мутациями в самом гене АТМ. К тому же последние исследования показывают, что белки еще одной репаративной системы — коррекции неспаренных оснований (MMR) — напрямую вовлечены в активацию АТМ. Обнаружено, что сразу после действия ионизирующей радиации MLH1 связывается с АТМ, а MSH2 — с CHK2 (Brown et al., 2003). Можно предположить, что система репарации неспаренных оснований распознает повреждения, вызванные ионизирующей радиацией, образуя молекулярные «строительные леса», которые позволяют АТМ фосфорилировать CHK2, активируя таким образом чекпойнт S-фазы, т. е. для быстрой реакции АТМ на облучение необходима и нормальная активность системы MMR.

Вероятно, именно к случаю АТ-вариант относятся изучаемые нами AT2SP и AT1SP. По крайней мере, таково мнение об этом одного из ведущих специалистов по атаксии проф. Колина Арлетта (С. Arlett) из Университета графства Сассекс, с которым мы обсуждали наши результаты. В нашей лаборатории Игушевой с соавторами (1999) было показано, что в клетках штамма AT2SP затронуты процессы преимущественной репарации транскрибируемых генов транскрибируемой нити ДНК после действия ионизирующей радиации. К сожалению, такие крайне интересные результаты были получены только на этих

клетках, и по этому критерию AT2SP невозможно сравнить с другими штаммами. Для штамма AT1SP подобных данных нет. Все ранее полученные в нашей лаборатории результаты подтверждают, что штамм AT1SP еще несколько менее чувствителен к ионизирующей радиации, чем AT2SP, хотя и свидетельствуют о том, что мы имеем дело с настоящей АТ (Хомасуридзе и др., 1999).

Появление во всех без исключения клетках АТ детектируемых количеств P53 уже через 1 ч после γ -облучения подтверждает сложившееся в науке представление о том, что функцию АТМ по фосфорилированию P53 через какое-то время способна взять на себя родственная ей протеинкиназа АТР. Время, на которое реакция клеток дикого типа отличается от реакции АТ-клеток, как раз и характеризует отставание действия одной протеинкиназы от другой. В наших опытах оно оказалось равно приблизительно 1 ч. В случае AT1SP, когда детектируемые количества P53 наблюдаются раньше, мы можем предполагать наличие какого-то специфического для данного индивидуума механизма, например, позволяющего АТР более раннее фосфорилирование P53 и таким образом приводящего к формированию данного фенотипа АТ-варианта.

Удлинение временного промежутка, в течение которого наблюдается повышенное количество белка P53, характерное для всех изученных АТ-клеток, показывает, что роль белка АТМ в его взаимодействии с P53 не ограничивается только первыми минутами после повреждения. Вероятно, длительность стабилизации белка P53 может быть связана не только с фосфорилированием самого P53 по серину-15 и серину-20, приводящим к его активации и высвобождению из комплекса с MDM2, но зависит и от фосфорилирования других белков, поддерживающих арест клеточного цикла и активацию систем репарации ДНК.

Авторы приносят благодарность проф. Аде Кольман (Стокгольмский государственный университет, Швеция) и проф. Алану Леману (Графффорд-центр Университета графства Сассекс, Великобритания) за любезно предоставленные клеточные линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49451) и программы «Биологические науки — медицине» президиума РАН (2004—2005).

Список литературы

- Игушева О. И., Спивак И. М., Михельсон В. М., Плескач Н. М., Жестяников В. Д. 1999. Дефект преимущественной репарации γ -индуцированных одонитевых разрывов ДНК при атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 41 (2) : 167—172.
- Комарова Е. А., Гудков А. В. 2000. Супрессия p53: новый подход к преодолению побочных эффектов противоопухолевой терапии. Биохимия. 65 : 48—56.
- Лазовский И. Р. 1971. Клинические симптомы и синдромы. Рига: Звайгзне.
- Михельсон В. М. 1979. Дефекты репарации ДНК и хромосом при наследственных заболеваниях человека. Успехи соврем. генет. 8 : 51—83.
- Смирнова Н. В., Спивак И. М., Михельсон В. М. 1999. Исследование P53-статуса клеток больных прогерией и атаксией-телеангиэктазией после действия ионизирующей радиации. Цитология. 41 (8) : 721—728.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5) : 338—379.
- Хомасуридзе М. М., Спивак И. М., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 1999. Особенности радиочувствительности клеток больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 41 (5) : 412—419.
- Чумаков П. М. 2000. Функция p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия. 65 : 34—47.
- Arlett C. F., Priestly A. 1985. As assessment of the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. In: R. A. Gatti, M. Swift (eds.). Ataxia-telangiectasia: genetics, neuropathology, and immunology of a degenerative disease of childhood. New York: Alan R. Liss, Inc. 1—63.
- Brown K. D., Rathi A., Kamath R., Beardsley D. I., Zhan Q., Mannino J. L., Baskaran R. 2003. The mismatch repair system is required for S-phase checkpoint activation. Nat. Genet. 33 : 80—84.
- Christmann M., Tomicic M. T., Roos W. P., Kaina B. 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology. 193 : 3—34.
- Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. Nat. Genet. 32 : 89—90.
- Fei P., El-Deiry W. S. 2003. P53 and radiation responses. Oncogene. 22 : 5774—5783.
- Hickson I. D. 2003. RecQ helicases: caretakers of the genome. Nature Rev. Cancer. 3 : 169—178.
- Huang L., Shyder A. R., Morgan W. F. 2003. Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. Oncogene. 22 : 5848—5854.
- Iliakis G., Wang Y., Guan J., Wang H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. Oncogene. 22 : 5834—5847.
- Kaufmann W. K. 1995. Cell cycle checkpoints and DNA repair preserve the stability of the human genome. Cancer Metastasis Rev. 14 : 31—41.
- Kim S. T., Kastan M. B. 2002. Involvement of the cohesin protein Sml1 in ATM-dependent and independent response to DNA damage. Genes Develop. 16 : 560—570.
- Kolman A., Spivak I., Naslund M., Dusinska M., Cedervall B. 1997. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts. Environ. Mol. Mutagen. 30 : 40—46.
- Lehmann A. R. 2002. Replication of damaged DNA in mammalian cells: new solutions to the old problem. Mutat. Res. 59 : 23—34.
- Maser R. S., DePinho R. A. 2002. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. Science. 297 : 565—569.
- Nakoyama H. 2002. RecQ family helicases: roles as the tumor suppressor proteins. Oncogene. 21 : 9008—9021.
- Norbury C. J., Zhivotovsky B. 2004. DNA damage-induced apoptosis. Oncogene. 23 : 3797—2808.
- Nygren J., Cedervall B., Eriksson S., Dusinska M., Kolman A. 1994. Induction of DNA strand breaks by ethylene oxide in human diploid fibroblasts. Environ. Mol. Mutagen. 24 : 161—167.
- O'Driscoll M., Ruiz-Perez V. L., Woods C. G., Jeggo P. A., Goodship J. A. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. Nat. Genet. 33 : 497—501.
- Powell S. N., Kachnic L. A. 2003. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. Oncogene. 22 : 5784—5791.
- Pulverer B. 2003. ATM Machine. Nature Cell Biol. 5 : 96.
- Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dork T., Bendix R., Skawran B., Stuhmann M., Wegner R.-D., Sperling K., Banin S., Shiloh Y., Baumer A., Bernthaler U., Sennefelder H., Brohm M., Weber B. H. F., Schindler D. 1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia-telangiectasia families. Hum. Mol. Genet. 8 : 69—79.
- Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vana-gaite L., Tagle D., Smith S., Uziel T., Sfez S., Ashkenazi S., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S. A., Simmons A., Cli-

- nes G. A., Sartiell A., Gatti R. A., Chessa L., Sanal O., Lavin M. F., Jaspers N. G. J., Taylor A. M. R., Arlett C. F., Miki T., Weissman S. M., Lovett M., Collins F. S., Shiloh Y. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 268 : 1749—1753.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews*. 3 : 155—168.
- Shiloh Y., Pashad R., Frydman M., Sanford K. K., Portnoi S., Ziv Y., Jones G. M. 1989. G2 chromosomal radiosensitivity in families with ataxia-telangiectasia. *Hum. Genet.* 84 : 15—18.
- Taylor A. M. R. 1992. Ataxia telangiectasia genes and predisposition to leukemia, lymphoma and breast cancer. *Br. J. Cancer*. 66 : 5—9.
- Taylor A. M. R., Flude E., Laher B., Stacey M., McKay E., Watt J., Green S. H., Harding A. E. 1987. Variant forms of ataxia telangiectasia. *J. Med. Genet.* 24 : 669—677.
- Valerie K., Povirk L. 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 22 : 5792—5812.
- Wang X. W., Yeh H., Schaffer I., Roy R., Moncollin V., Egly J. M., Wang Z., Friedberg E. C., Evans M. K., Taffe B. G., Bohr V. A., Weeda G., Hoeijmakers J. H. J., Forrester K., Harris C. C. 1995. P53 modulation of TFIIH-associated nucleotid excision repair activity. *Nat. Genet.* 10 : 188—191.
- Zhou B.-B. S., Bartek J. 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature Reviews*. 4 : 216—225.

Поступила 21 IV 2005

SOME STABILIZATION FEATURES OF P53 PROTEIN IN GAMMA-IRRADIATED CELLS OF PATIENTS WITH ATAXIA-TELANGIECTASIA

I. M. Spivak,¹ N. V. Smirnova,¹ N. M. Pleskach,¹ T. A. Ledascheva,² V. M. Mikhelson¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² Municipal Consultation-Diagnostic Medical Genetics Centre, St. Petersburg;
e-mail: irina_spivak@hotmail.com

Stabilization of P53 protein in cells isolated from patients with a grave hereditary disease ataxia-telangiectasia (AT), characterized by strongly enhanced sensitivity to ionizing radiation and impairment of cell cycle control after DNA damage, was studied. The level of expression of these reactions by patients may vary, and it tends to be linked with the severity of the disease. In all AT strains studied, both acquired by the authors and obtained from foreign colleagues, we observed the alteration of timing and character of stabilization of P53 protein, after the action of ionizing radiation in sublethal dosage, as compared to that in cells from healthy donor.