

ДИСКРИМИНАЦИЯ ГЕТЕРОЗИГОТНОГО НОСИТЕЛЬСТВА АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

© И. М. Спивак, Н. В. Смирнова, Н. М. Плескач, Т. А. Ледащева, В. М. Михельсон

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

Методами непрямой иммунофлуоресценции с использованием конфокальной микроскопии в клетках, полученных от членов семьи больного атаксией-телеангиэктазией (пробанда AT6SP) и кровных родственников пробанда — сестры AT(S)6SP и отца AT(F)5SP — были изучены качественные различия стабилизации белка P53 через разные сроки после гамма-облучения.

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

Возможность повышенной радиочувствительности среди здоровых лиц и больных обычно не учитывается или недостаточно учитывается в медицинской практике. Принято считать, что реакция всех или почти всех людей на проникающие излучения практически одинакова. Между тем это не так. Известен целый ряд генетических дефектов, сопровождающихся повышенной радиочувствительностью. Нас в первую очередь интересовали те наследственные синдромы, при которых клетки имеют повышенную радиочувствительность, так как это непосредственно связано с задачами, стоящими сейчас перед радиационной цитологией. Это такие наследственные заболевания, как атаксия-телеангиэктазия (АТ), ряд форм пигментной ксеродермы и прогерий и некоторые другие. Это не составляло бы серьезной медицинской проблемы, если бы речь шла только о самих таких больных, поскольку сами по себе эти рецессивные наследственные болезни, к счастью, достаточно редки. Однако при некоторых из них повышенной радиочувствительностью обладают не только сами больные, но и гетерозиготные носители соответствующего мутантного гена. При этом распространенность гетерозиготного носительства несопоставимо выше, чем частота самих заболеваний.

АТ является самым распространенным синдромом наследственно повышенной радиочувствительности, однако частота этого заболевания не превышает 1 случая на 20—200 тыс. рождений. Но гетерозиготные носители соответствующего мутантного гена, называемого *atm*, составляют по разным оценкам от 7 до 10 % в различных человеческих популяциях (Михельсон, 1979; Спивак, 1999; Thompson et al., 2005; Wu et al., 2005). При этом гетерозиготное носительство мутации не приводит к заболеванию АТ, но сопряжено с резко повышенным риском злокачественных новообразований (Andrieu et al., 2005; Olsen et al., 2005) и, как мы показали, с повышенной ра-

диочувствительностью клеток. Помимо гетерозиготных носителей АТ повышенной клеточной радиочувствительностью обладают и носители некоторых мутаций в одном из генов, вовлеченных в глобальный ответ клетки на повреждение, и это, как правило, выясняется поздно, обычно при неудачной радиотерапии опухолей. Знать о подобной повышенной радиочувствительности человека важно в первую очередь как раз при необходимости лучевой терапии, чаще всего в случае злокачественных новообразований, т. е. в том числе именно при гетерозиготном носительстве мутаций в различных генах, участвующих в репарации ДНК. Можно привести пример описанного в Англии больного BR180, имевшего повреждение в гене *lig4*, ответственном за прямое негомологичное воссоединение двунитевых разрывов ДНК, который погиб после сеанса лучевой терапии (Jeggio et al., 1998).

В настоящей работе мы остановимся именно на АТ. Это заболевание очень подробно описано, является одним из так называемых 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; Игушева и др., 1999; Спивак, 1999; Хомасуридзе и др., 1999; Concannon, 2002; Pulverer, 2003; Taylor, Byrd, 2005). К возникновению этого тяжелого заболевания приводят мутации в гене *atm*, кодирующем белок АТМ (Sandoval et al., 1999). В Санкт-Петербурге описано несколько семей с АТ, что облегчает проведение совместного исследования с врачами-клиницистами.

Белок P53 является одним из наиболее хорошо изученных клеточных антионкогенов, он вовлечен во мно-

жество сложных внутриклеточных процессов (Комарова, Гудков, 2000; Чумаков, 2000). Исходя из сложившихся к настоящему времени представлений о необходимом для табилизации белка P53 фосфорилировании его протеинкиназой ATM по серину в 15-м положении (Shiloh, 2003) мы продолжили исследования методом непрямой иммунофлуоресценции. Во всех изученных нами ранее линиях выявлена задержка стабилизации белка P53 в карิโอплазме после γ -облучения не менее чем на 0.5 ч по сравнению с контрольной линией VH-10, где белок P53 наблюдается практически сразу после облучения (Спивак и др., 2005). Через 0.5 ч после γ -облучения ни в одной из проверенных линий AT нами не было обнаружено детектируемого количества белка P53 в карิโอплазме, т. е. в этот промежуток времени не происходит стабилизации белка P53, так как ATM не фосфорилирует его по серину в положении 15. Появляющийся примерно с 1-часовой задержкой ядерный сигнал свидетельствует о том, что какая-то другая протеинкиназа, вероятнее всего ATR, берет на себя эту функцию.

Материал и методика

Клеточные культуры. В работе были использованы как стабильные клеточные линии, так и штаммы диплоидных фибробластов, полученные от больных AT и здоровых доноров.

Клеточный штамм VH-10 — диплоидные фибробласты крайней плоти мальчика 11 лет, используемые в исследовании в качестве клеток здорового донора (Kolman et al., 1992; Nygren et al., 1994). Получены от проф. Ады Кольман (Ada Kolman, Стокгольмский университет, Швеция).

Клетки AT6SP — штамм диплоидных фибробластов девушки 16 лет, больной AT. Первичные культуры фибробластов кожи получали из биопсий кожи предплечья.

Клетки AT(S)6SP — штамм диплоидных фибробластов фенотипически здоровой девушки 20 лет, сестры больной AT6SP. Первичные культуры фибробластов кожи получали из биопсий кожи предплечья.

Клетки AT(F)6SP — штамм диплоидных фибробластов фенотипически здорового мужчины 54 лет, отца больной AT6SP. Первичные культуры фибробластов кожи получали из биопсий кожи предплечья.

Клеточная линия A431 — клетки эпидермальной карциномы человека, применяемые при иммунофлуоресцентном исследовании. Клетки A431 получены нами из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН).

Клетки выращивали в пластиковых флаконах, на чашках Петри (Nunclon, США) и на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри, на среде F-10 или DMEM («Биолот», Россия, или Sigma, США) с добавлением 10 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) при 37 °C в атмосфере с содержанием 5 % CO₂.

Иммунофлуоресцентный анализ белка P53 проводили на фиксированных клетках. Выращенные на покровных стеклах до субконфлюэнтного состояния клетки фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в PBS на льду в течение 10 мин. После интенсивной промывки PBS клетки пермеабелизировали в 0.5%-ном рас-

творе 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, препятствующий 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). Гамма-облучение проводили на установке ЛМБ-гамма-1.

Результаты

Результаты непрямого иммунофлуоресцентного анализа приводятся на рис. 1—3. Рисунки, свидетельствующие о постоянном наличии большого количества белка P53 как в ядрах, так и в цитоплазме клеток A 431, мы не приводим — они были представлены нами ранее (Смирнова и др., 1999). Для контроля мы также использовали окрашивание клеток антителами к белку теплового шока HSP70, который индуцируется в клетках после γ -облучения. При этом во всех изученных клетках через 0.5 ч после облучения мы наблюдали яркое специфическое окрашивание HSP70 как в ядре, так и в цитоплазме, т. е. клетки AT способны неспецифически реагировать на стресс так же, как и клетки здорового донора. Рисунки мы не приводим, так как они уже опубликованы ранее (Спивак и др., 2005).

На рис. 1 видно, что в ядрах интактных клеток как у здорового донора, так и у больной атаксией-телеангиэктазией AT6SP и ее кровных родственников — отца AT(F)6SP и сестры AT(S)6SP — не наблюдалось специфического свечения, указывающего на наличие белка P53 (рис. 1, а—г). 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.

На рис. 2 видно, что уже через 0.5 ч после облучения в дозе 5 Гр в клетках здорового донора VH-10 в ядрах выявляется яркое специфическое зеленое свечение, соответствующее появлению детектируемых данным методом количеств белка P53 (рис. 2, а). Это свидетельствует о быстрой стабилизации белка P53 в ядре клетки в ответ на повреждение ДНК. Подобная же картина сохраняется и через 1 ч после облучения — белок P53 в стабильном состоянии выявляется в ядре, а в цитоплазме практиче-

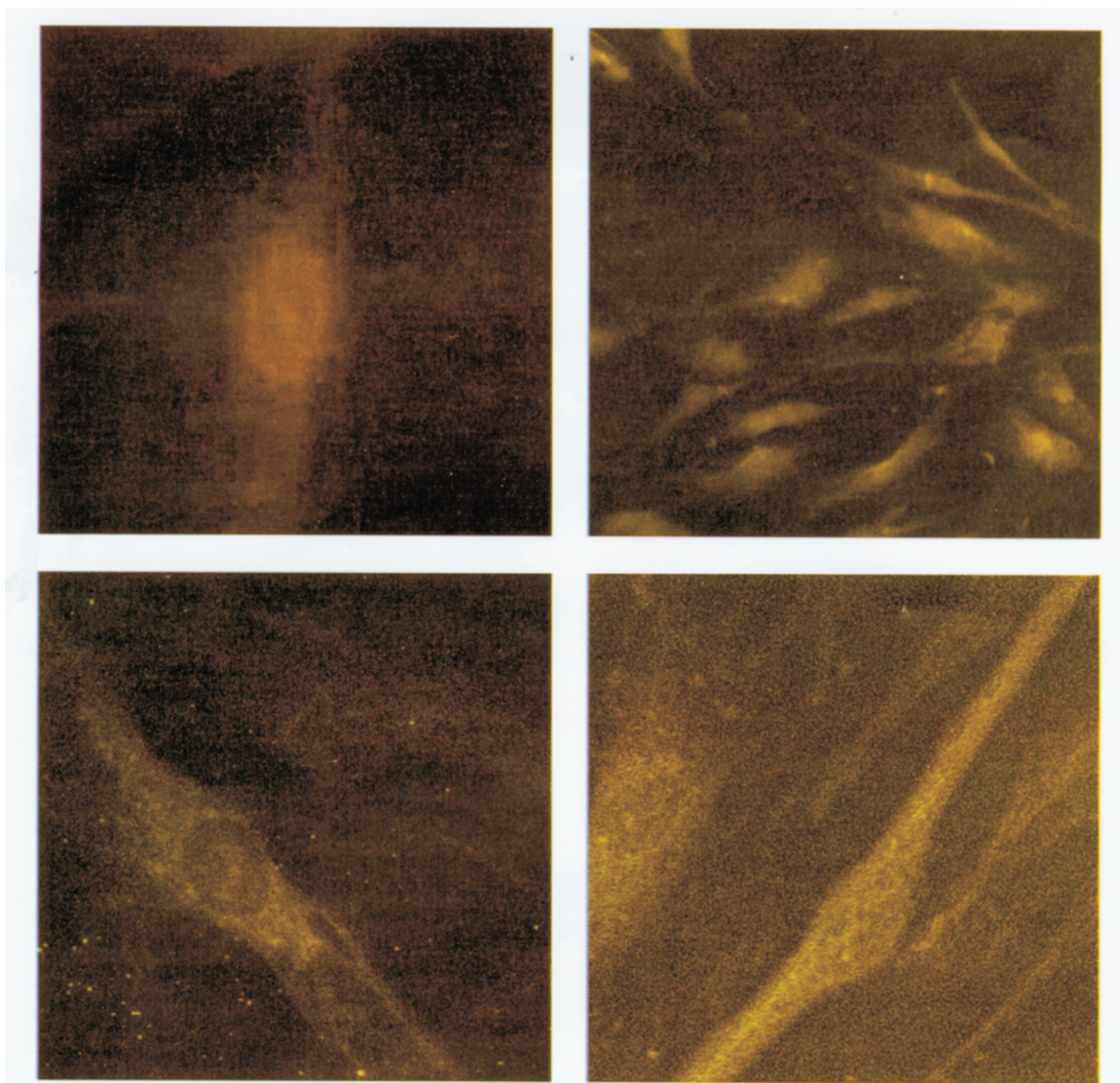


Рис. 1. Детекция белка P53 в клетках VH-10, AT6SP, AT(S)6SP и AT(F)6SP в контроле без облучения.

ски отсутствует (рис. 3, *а*). Это подтверждает, что белок P53 активно вовлечен в раннюю фазу глобального клеточного ответа на повреждение ДНК и его ранняя стабилизация зависит от нормального функционирования протеинкиназы ATM (ср.: Спивак и др., 2005).

В клетках AT6SP и AT(F)6SP через 0.5 ч после γ -облучения картина полностью соответствовала контрольной в интактных клетках (рис. 2, *б*, *г*). Особая же ситуация складывается в клетках, полученных от сестры больной AT(S)6SP (рис. 2, *в*). Через 0.5 ч после облучения в ядрах этих клеток мы наблюдали специфическое свечение, хотя и несколько менее яркое, чем в ядрах клеток VH-10. Основная масса белка P53 при этом детектируется не в ядрах, а в цитоплазме, что говорит о том, что стабилизация белка P53 неполная и он, вероятно, остается связанным с белком MDM2, который способствует его активному перемещению в цитоплазму. Ядерное свечение наблюдается по всему ядру, но не во всех клетках, а примерно в половине из них (рис. 2, *в*).

При продолжении наблюдения облученных клеток на рис. 3 видно, что через 1 ч после облучения картина несколько меняется: в клетках AT6SP появляется небольшое специфическое ядерное свечение, свидетельст-

вующее о наличии там детектируемых данным методом количеств белка P53. При этом оно выражено значительно слабее, чем в контрольных клетках VH-10 и клетках AT(S)6SP и через 0.5, и через 1.0 ч после облучения, и локализуется по самому краю кариоплазмы. Одновременно видно активное свечение в цитоплазме, особенно в околядерной области, что свидетельствует или о задержке белка P53 в цитоплазме, или, что вероятнее, о быстром перемещении его туда (рис. 3, *б*). В клетках AT(F)6SP (рис. 3, *г*) наблюдается достаточно схожая по локализации картина распределения белка P53, с той только разницей, что само свечение несколько более интенсивное. В клетках AT(S)6SP сохраняется та же тенденция, что и через 0.5 ч после γ -облучения. Яркое специфическое свечение видно как в ядре, так и в цитоплазме (рис. 3, *в*), причем ядерное свечение через 1 ч наблюдается уже не менее чем в 80 % клеток и, так же как и на рис. 2, *в*, захватывает всю площадь ядра. Таким образом, через 1 ч после γ -облучения ядра клеток AT(S)6SP свяжутся с той же интенсивностью, что и ядра клеток VH-10, различаясь между собой только тем, что к этому времени P53 из ядер VH-10 еще не перемещается в цитоплазму, а в клетках AT(S)6SP этот процесс начинается уже через 0.5 ч.

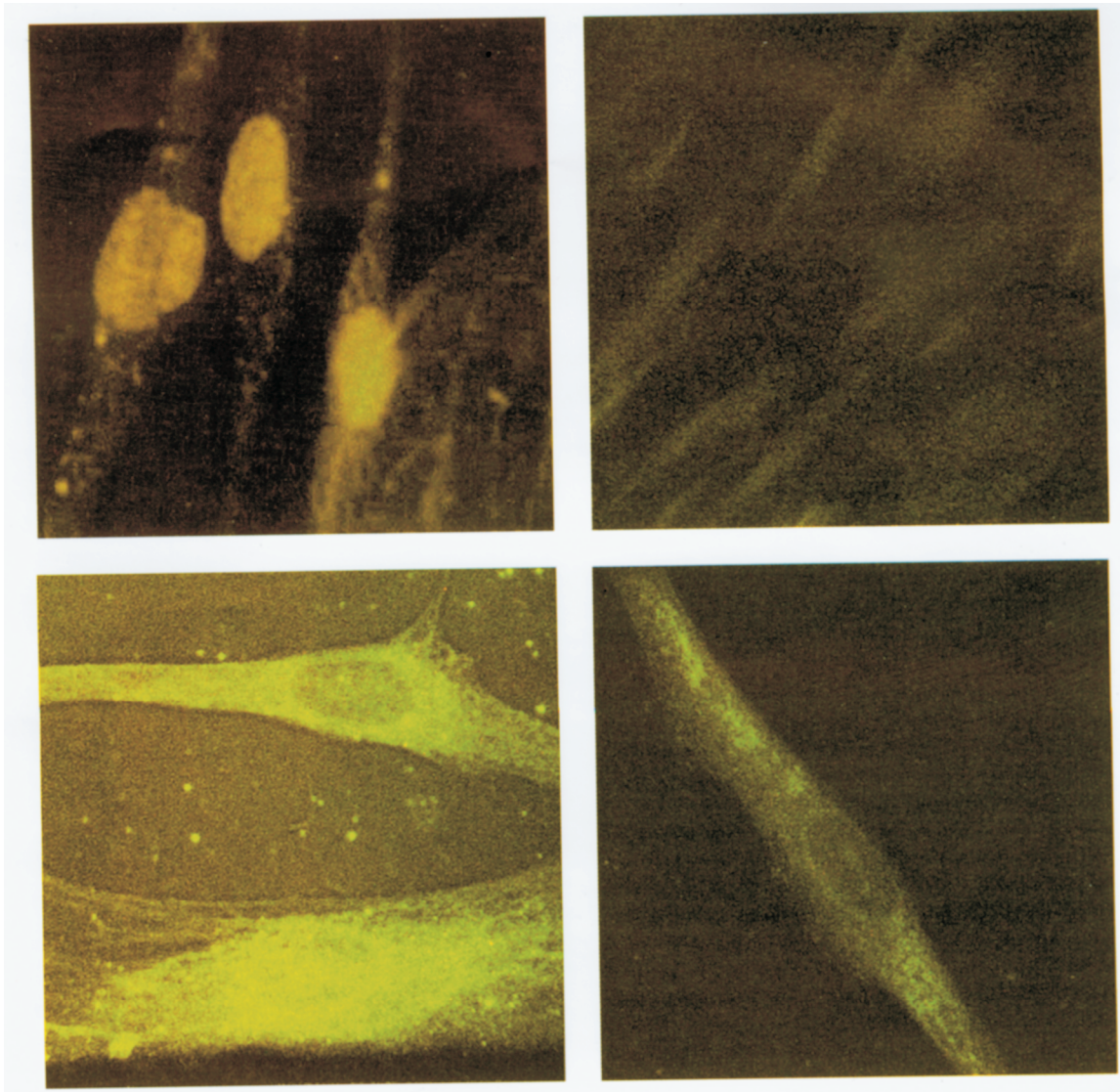


Рис. 2. Детекция белка P53 в клетках VH-10, AT6SP, AT(S)6SP и AT(F)6SP через 0.5 ч после облучения в дозе 5 Гр.

Обсуждение

Ранее полученные данные показывают резкое отличие клеток АТ (как типичной, так и вариантной формы) от клеток здорового донора, в первую очередь по времени стабилизации белка P53 после γ -облучения (Смирнова и др., 1999; Спивак и др., 2005). При изучении этим методом клеток больной АТ и ее кровных родственников (отец — гетерозиготный носитель АТ, сестра — вероятный гетерозиготный носитель) после действия ионизирующей радиации в сублетальной дозе наблюдается изменение времени и характера стабилизации белка P53 по сравнению с клетками здорового донора. В ядрах интактных клеток как у здорового донора, так и у больных АТ не наблюдалось специфического свечения, указывающего на наличие белка P53. 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 в комплексе с белком MDM2, где подвергается протеасомной деградации. Но уже через 0.5 ч после γ -об-

лучения в дозе 5 Гр в клетках здорового донора (клеточная линия VH-10) в ядрах выявляется яркое специфическое зеленое свечение, соответствующее появлению детектируемых данным методом количеств белка P53. Это свидетельствует о стабилизации белка P53 в ядре клетки и показывает, что этот белок активно вовлечен в клеточный ответ на повреждение ДНК. В такой же временной промежуток, т. е. через 0.5 ч после γ -облучения, в ядрах клеток всех изученных штаммов больных АТ (кроме AT1SP) не появлялось специфического свечения детектируемых этим методом количеств белка P53. При этом явления, наблюдаемые в цитоплазме клеток разных больных, могли существенно отличаться друг от друга (Спивак и др., 2005). Т. е. именно быстрое появление достаточных количеств белка P53 и его ядерная локализация после повреждения ДНК свидетельствуют о нормальном функционировании в клетке протеинкиназы АТМ, а отсутствие в течение начального временного периода после облучения детектируемых количеств белка P53 в клетке, скорее всего, свидетельствует о каком-либо дефекте протеинкиназы АТМ. При окраске антителами на основной белок теплового шока Hshp70 мы видим его

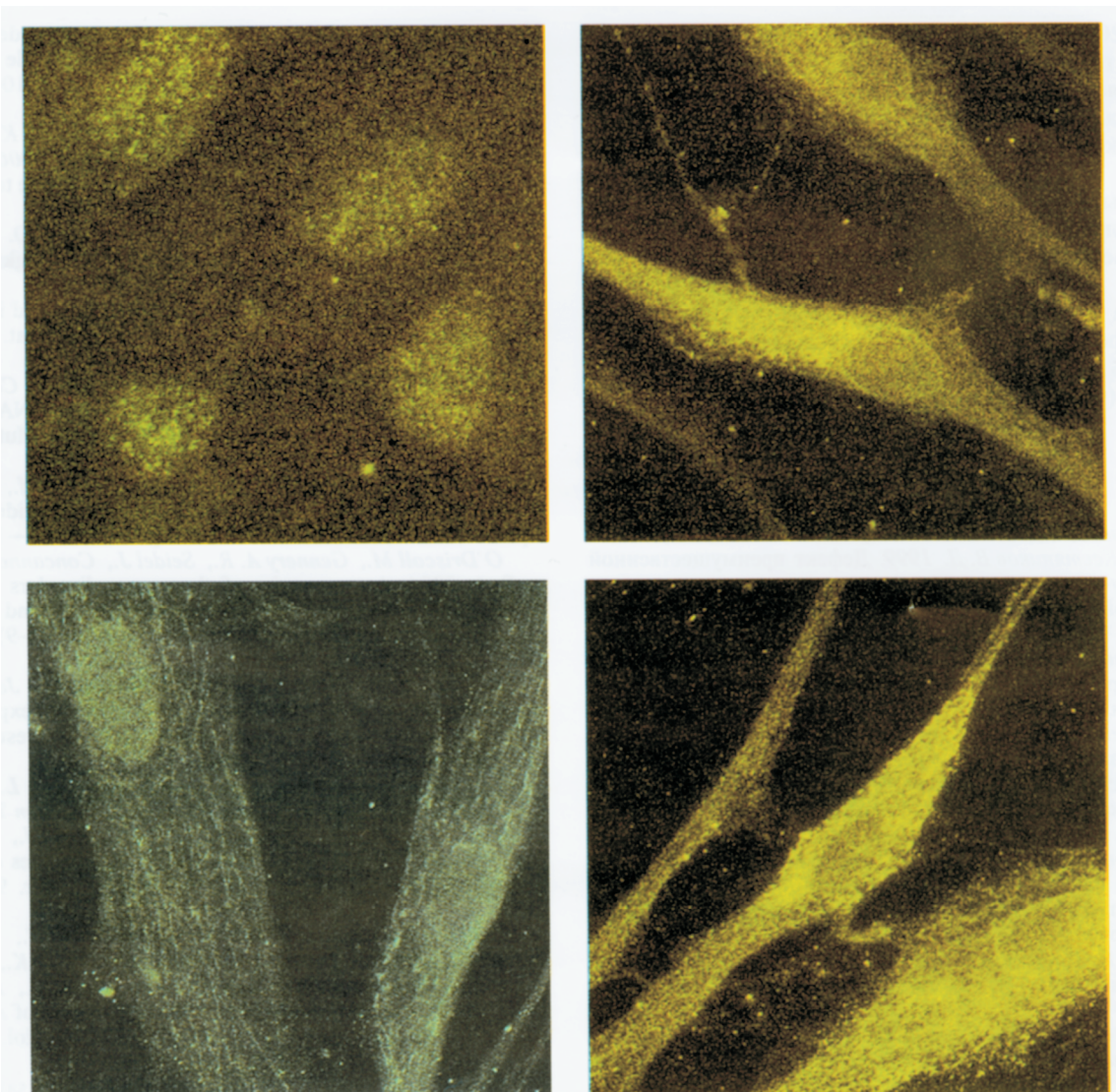


Рис. 3. Детекция белка P53 в клетках VH-10, AT6SP, AT(S)6SP и AT(F)6SP через 1 ч после облучения в дозе 5 Гр.

появление в ядре сразу же после облучения, что свидетельствует о независимости функций этого белка от ATM.

Появление во всех без исключения клетках AT детектируемых количеств белка P53 уже через 1 ч после γ -облучения подтверждает сложившееся в науке представление о том, что функцию ATM по фосфорилированию P53 через какое-то время способна взять на себя родственная ей протеинкиназа ATR (O'Driscoll et al., 2003, 2004), дефект которой приводит к развитию другого тяжелого наследственного заболевания — синдрома Секеля.

Время, на которое отличается реакция клеток дикого типа от реакции AT-клеток, как раз и характеризует отставание действия одной протеинкиназы от другой. В наших опытах оно оказалось равным приблизительно 1 ч (Спивак и др., 2005).

Исследование в такой же временной промежуток клеток штаммов больных AT и их кровных родственников (возможных гетерозиготных носителей AT) представлялось нам достаточно продуктивным, и наши и результаты это подтвердили. Очевидно, что не все кровные родственники больного необходимо являются гетерозиготными носителями AT; таким образом, нам предоста-

вилась уникальная возможность попытаться дискриминировать это носительство имеющимися в нашем распоряжении методами. Так, нами были исследованы кровные родственники больной AT6SP — отец AT(F)6SP, безусловно являющийся носителем заболевания, и ее сестра AT(S)6SP, которая может быть носителем AT только с вероятностью около 0.5.

К настоящему времени обнаружено более 80 мутаций, приводящих к полной или частичной инактивации гена белка ATM и развитию у пациентов AT различной степени клинической выраженности, и несколько меньшее число характерных для различных популяций полиморфизмов, не влияющих на активность белка ATM (Sandoval et al., 1999), т. е. практически каждая новая описанная семья несет свою особенную мутацию (Eang et al., 2003; Gumy-Pause et al., 2006).

Выявление этих мутаций в каждом конкретном случае AT и последующее генетическое обследование всех членов семьи, разумеется, возможны, но крайне трудоемки и дорогостоящи (Heinrich et al., 2006). В то же время необходимость реального медицинского прогноза для членов семьи — возможных носителей AT — является очень важным (Cavasiuti et al., 2005; Olsen, 2005; Thomp-

son et al., 2005). Предложенный нами метод дискриминации АТ-гетерозигот по времени стабилизации белка Р53 представляется достаточно информативным и достоверным и может служить тестом на выявление носителей АТ среди кровных родственников больного.

Авторы приносят благодарность проф. Аде Кольман (Фонд исследований без использования животных, Стокгольм, Швеция).

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

Список литературы

- Игушева О. И., Спивак И. М., Михельсон В. М., Плескач Н. М., Жестяников В. Д. 1999. Дефект преимущественной репарации γ -индуцированных одностранных разрывов в транскрибируемой 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 Р53-статуса клеток больных прогерией и атаксией-телеангиэктазией после действия ионизирующей радиации. Цитология. 41 (8): 721—728.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные болезни с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5): 338—380.
- Спивак И. М., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Ледацева И. А., Михельсон В. М. 2005. Особенности стабилизации белка Р53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после гамма-облучения. Цитология. 47 (10): 898—906.
- 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.
- Andrieu N., Cavaciuti E., Laugel A., Ossian K., Janin N., Hall J., Stoppa-Lyonnet D. 2005. Ataxia-telangiectasia genes and breast cancer risk in a French family study. J. Dairy Res. 72 (Spec.): 73—80.
- Cavaciuti E., Laugel A., Janin N., Ossian K., Hall J., Stoppa-Lyonnet D., Andrieu N. 2005. Cancer risk according to type and location of ATM mutation in ataxia-telangiectasia families. Genes Chromosomes Cancer. 42: 1—9.
- Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. Nature Genet. 32: 89—90.
- Fang N. Y., Greider T. C., Weisenburger D. D., Chan W. C., Vose J. M., Armitage J. O., Mayer R. A., Pike B. L., Collins F. S., Hacia J. G. 2003. Oligonucleotide microarrays demonstrate the highest frequency of ATM mutations in the mantle cell subtype of lymphoma. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100: 5372—5377.
- Heinrich T., Prowald C., Friedl R., Gottward B., Kalb R., Neveling K., Herterich S., Hoehn H., Schindler D. 2006. Exclusion/conformation of Ataxia-telangiectasia via cell-cycle testing. Eur. J. Pediatr. 165: 250—257.
- Gumy-Pause F., Wacker P., Maillet P., Betts D. R., Sappino A. P. 2006. ATM alteration in childhood non-Hodgkin lymphoma. Cancer Genet. Cytogenet. 166: 101—111.
- Jeggo P. A. 1998. Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. Radiat. Res. 150: 80—91.
- 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.
- Nygren J., Cedervall B., Erikssons 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., Gennery A. R., Seidel J., Concannon P., Jeggo P. A. 2004. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-ScKel syndrome. DNA Repair (Amsterdam). 3 (8—9): 1227—1235.
- 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 ScKel syndrome. Nat. Genet. 33: 497—501.
- Olsen J. H., Hahnemann J. M., Borresen-Dale T. L., Tretli S., Kleinerman R., Sankila R., Hammarstrom L., Robsahm T. E., Kaariainen H., Bregard A., Brondum-Nielsen K., Yuen J., Tucker M. 2005. Breast and other cancer in 1445 blood relatives of 75 Nordic patients with ataxia-telangiectasia. Br. J. Cancer. 93: 260—265.
- Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dork T., Bendix R., Skavran B., Stuhmann M., Wegner R.-D., Sperling K., Banin S., Shiloh Y., Baumer A., Bernthaler U., Seneffelder 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.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nature Reviews. 3: 155—168.
- 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., Byrd P. J. 2005. Molecular pathology of ataxia-telangiectasia. J. Clin. Pathol. 58: 1009—1015.
- 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.
- Thompson D., Duedal S., Kirner J., McGuffog L., Last J., Reiman A., Byrd P., Easton D. F. 2005. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutations carriers. J. Nat. Cancer Inst. 97: 813—822.
- Wu D., Yang H., Xiang W., Zhou L., Shi M., Julies G., Laplanche J. M., Ballard B. R., Guo Z. 2005. Heterozygous mutation of ataxia-telangiectasia mutated gene aggravates hypercholesterolemia in apoE-deficient mice. J. Lipid Res. 46: 1380—1387.

DISCRIMINATION OF HETEROZYGOTE CURRENCY OF ATAXIA-TELANGIECTASIA
BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS

I. M. Spivak, N. M. Smirnova, N. M. Pleskach, T. A. Ledashcheva, V. M. Mikhelson

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

The qualitative differences in P53 protein stabilization after ionizing irradiation in different doses were found in cells of members of ataxia-telangiectasia (AT) family — proband AT6SP, her sister AT(S)6SP and father AT(F)6SP. The method of indirect immunofluorescence with confocal microscopy was used.

Key words: ataxia-telangiectasia, P53, ionizing radiation, heterozygote currency.
