

ДИАГНОСТИКА АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ С ПОМОЩЬЮ ЭКСПРЕСС-ТЕСТА, ОСНОВАННОГО НА МЕТОДЕ НЕПРЯМОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

© М. Л. Куранова,^{1,4} Т. А. Ледащева,² Е. К. Тулуш,² Д. Л. Беляев,³ С. В. Жеребцов,¹
Н. М. Плескач,¹ В. В. Прокофьева,¹ В. М. Михельсон,¹ И. М. Спивак¹

¹ Институт цитологии РАН Санкт-Петербург,

² Санкт-Петербургский медико-генетический диагностический центр,

³ С.-Петербургский государственный университет и

⁴ С.-Петербургский государственный политехнический университет;

¹ электронный адрес: miryakuranova@gmail.com

Атаксия-телеангиэктазия (АТ) является тяжелым наследственным нейродегенеративным заболеванием, развивающимся при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm*. Ген *atm* кодирует ключевой белок клеточного ответа на повреждение ДНК — протеинкиназу АТМ. При возникновении двухнитевых разрывов ДНК протеинкиназа АТМ автофосфорилируется и в клетке появляется ее активная форма — фосфо-АТМ (Р-АТМ), обнаруживаемая модифицированным методом непрямой иммунофлуоресценции. В ядрах клеток, имеющих нормальный ген *atm*, после воздействия агентов, вызывающих двухнитевые разрывы ДНК, выявляется Р-АТМ, в то время как в клетках, несущих мутантные варианты гена *atm*, Р-АТМ не выявляется. Эта особенность может быть использована в клинике для подтверждения диагноза АТ в сложных случаях.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, ген *atm*, иммунофлуоресценция, протеинкиназа АТМ.

Синдром атаксия-телеангиэктазия (АТ), характеризующийся мозжечковой атаксией и кожно-конъюнктивальной телеангиэктазией, в 1941 г. впервые описала французская ученая Луи-Бар. В 1958 г. Бодер и Сэджвик (Boder, Sedgwick, 1958) предложили название АТ и добавили третий важный компонент этого синдрома — тяжелую рецидивирующую бронхолегочную патологию (Каламкарян, Шаднев, 1984). В дальнейшем Тейлор (Taylor, 1978) предположил, что причиной чрезвычайно большого количества радиационно-индуцированных хромосомных aberrаций в клетках больных АТ по сравнению с клетками здоровых доноров является нарушение репарации ДНК при двухнитевых разрывах, и именно это служит причиной повышенной радиочувствительности.

На сегодняшний день известно, что данный синдром (имеющий также названия: синдром Луи-Бар, синдром Бодер—Седжвика, ранняя прогрессирующая мозжечковая атаксия и цефало-окуло-кутанная телеангиэктазия) является тяжелым прогрессирующим мультисистемным нейродегенеративным заболеванием из группы факоматозов, наследуемым по аутосомно-рецессивному типу (ОММ заболевания: 208900, ОММ гена *atm*: 607585). Для больных характерны: патология центральной нервной системы (ЦНС), кожи, глаз, иммунологические нарушения, высокая предрасположенность к неоплазиям, прогероидные черты, резко повышенная чувствительность к ионизирующему излучению, ограниченная пролиферативная способность клеток и значительное укорочение теломера уже при рождении ребенка.

Частота заболевания варьирует в различных популяциях от 1 : 40 000 до 1 : 100 000—300 000 населения, но

доля гетерозиготных носителей гена *atm* в популяции значительно выше, чем можно ожидать по распространенности самого заболевания, и составляет от 1 до 7 %.

Причиной данного заболевания является мутация в гене *atm*. Ген локализован в хромосоме 11 (11q23), имеет размер 150 т. п. н. и содержит 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Pulverer, 2003).

Белок АТМ (ataxia-telangiectasia mutated), неактивный или отсутствующий в клетках больных АТ, — протеинкиназа, являющаяся ключевым регулятором механизма клеточного ответа на повреждение ДНК и возникновение конформационных изменений хроматина (Shiloh, 2003; Lavin, 2008). При этом протеинкиназа АТМ, обычно находящаяся в неактивной димерной форме, автофосфорилируется по серину в 1981-м положении и диссоциирует на две активные протеинкиназы — фосфо-АТМ (Р-АТМ), моментально начинающие фосфорилирование более чем 600 белков-мишеней (как активируя, так и ингибируя их активность) (Bakkenist, Kastan, 2003; Lavin, 2008). Одним из первых белков-мишеней Р-АТМ является протеинкиназа ШНК2, фосфорилирующая в свою очередь фосфатазу Cdc25A (Falck et al., 2001), которая в фосфорилированной форме не способна снять ингибирующее фосфорилирование циклинзависимой киназы CDK2, что приводит к остановке клеточного цикла (Burdon et al., 2002). Другой механизм G₁-блока клеточного цикла опосредован реакцией фосфорилирования АТМ белка Р53, что приводит к стабилизации последнего и его накоплению в клетке после повреждения ДНК (Kruse, Gu, 2009; Mirzaayans et al., 2012), а также проявлению его активности как фактора, усиливающего транскрипцию ингибитора циклинзависимой

ных киназ P21Waf1/Cip1 (Westphal, 1997). Кроме того, такие мишени ATM, как Nbs1, BRCA1, FANCD2 и SMC1, принимают участие в процессах репарации ДНК и аресте S-фазы клеточного цикла (Taniguchi et al., 2002; Xu et al., 2002; Yazdi et al., 2002; Kitagawa, Kastan, 2005; Zhan et al., 2010). При АТ функционирование белка ATM нарушено, и как следствие становится невозможным адекватный ответ клетки на повреждение ДНК, что приводит к накоплению в ней нерепарируемых повреждений. В этих условиях резко повышается риск клеточной трансформации или вероятность быстрого перехода к состоянию необратимого прекращения пролиферации, т. е. преждевременному клеточному старению (Lavin, 2008).

Симптомы преждевременного старения и повышенный риск развития злокачественных опухолей обнаруживаются и у родителей больных — гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* (Спивак, 1999; Concannon, 2002).

Ранее в нашей лаборатории было экспериментально подтверждено, что в клетках больных АТ одновременно реализуются две противоположно направленные клеточные программы: ускоренного старения — повышение количества классических маркеров старения, таких как SA- β -gal, SAHF, HP1- γ , γ -H2AX и 53BP1; трансформации — резкое снижение эффективности процессов репарации ДНК и высокий уровень хромосомных перестроек (Баренфельд и др., 1995; Хомасуридзе и др., 1999; Болуботко, 2009а, 2009б).

Опираясь на динамику процессов репарации ДНК после гамма-облучения, можно выявить не только наличие самого синдрома АТ, но и его гетерозиготное носительство (Спивак и др., 2005, 2007). Например, время, на которое достоверно различается появление детектируемого количества белка P53 после гамма-облучения в клетках здорового человека и больных АТ, равно 1 ч. Эта разница объясняется тем, что функцию ATM по фосфорилированию P53 через какое-то время способна взять на себя родственная протеинкиназа ATR, дефект которой приводит к развитию другого наследственного заболевания — синдрома Секеля (O'Driscoll et al., 2003). В клетках таких пациентов в ответ на повреждение ДНК появление p21Waf1/Cip1 — ингибитора циклинзависимых киназ — происходит со значительной задержкой (Полуботко и др., 2009а). Также АТ сопровождается эпигенетическими изменениями, в первую очередь нарушением фосфорилирования лизина в 9-м положении гистона H3 (H3-K9). Количество его триметилированной формы (Me3-H3-K9) в клетках больных существенно различается и может служить прогностическим маркером течения заболевания: при его снижении в клинической картине преобладают черты ускоренного старения, при повышении — сниженного иммунитета и опухолеобразования (Куранова, Спивак, 2011). На данный момент описано более 100 мутаций в гене *atm*, приводящих к АТ (Sandoval et al., 1999; Lee et al., 2013). Развитие болезни начинается примерно с 2 лет и в зависимости от вида мутации прогрессирует к 10—20 годам. Клиническая картина при разных формах АТ схожа, но в то же время характеризуется определенным клиническим полиморфизмом. Все больные АТ страдают ослабленным иммунитетом, кожно-конъюнктивальной телеангиэктазией, имеют признаки ускоренного старения, но тяжесть неврологических и неоплазийных проявлений различны (Lanzu et al., 1992; Спивак, 1999; Shiloh, 2003).

Целью нашей работы было создание и апробация лабораторного теста, основанного на методе непрямой им-

мунофлуоресценции с использованием антител к фосфорилированной форме ATM (P-ATM). P-ATM появляется в человеческих клетках с немутантным геном *atm* в результате автофосфорилирования неактивного димера белка ATM и его перехода в активную мономерную форму в ответ на возникновение двухнитевых разрывов ДНК под воздействием гамма-облучения или радиомиметика блеомицина. В клетках больных АТ, в которых этот белок или отсутствует, или неактивен. P-ATM не выявляется. Исследование проводилось *in vitro* на фибробластах больных АТ, больных атаксией другой этиологии, больных с другими синдромами нарушения репарации ДНК и здоровых доноров.

Материал и методика

Клеточные культуры. В работе были использованы следующие клеточные линии дермальных фибробластов кожи, полученные в Лаборатории радиационной цитологии: 1SP — донора 30 лет, имеющего инвалидность 2-й группы, не страдающего АТ; AT6SP — больной 26 лет с легкой формой заболевания АТ; AT8SP — больной 11 лет с тяжелой формой заболевания АТ; AT6SP — больной 26 лет с легкой формой заболевания АТ; Ss1SP — больной 1 года с синдромом Секкела; AT7SP — больной 4 лет с атаксией, вызванной опухолью мозжечка; XP2SP — больной 16 лет с пигментной ксеродермой; P1SP — пациента 4 лет с симптомами, клинически сходными с АТ; P2SP — пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ.

AT4BR — клетки больного AT4BR с генетически подтвержденным диагнозом АТ, полученные из Лаборатории А. Лемана в Траффорд-Центре (Университет графства Сассекс, Великобритания).

Клетки выращивали в пластиковых флаконах, чашках Петри (Nunc, США) и на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри, в среде F-10 или DMEM (Биолот, Россия, или Sigma, США) с добавлением 15 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина) при 37 °С в атмосфере с содержанием 5 % CO₂.

Получение первичной культуры фибробластов кожи. При помощи стандартной методики получали биоптат кожи из области предплечья доноров. Полученные фрагменты кожи помещали в чашку Петри в питательную среду DMEM с добавлением антибиотиков и механически диспергировали. Затем измельченные фрагменты помещали под покровное стекло в чашки Петри диаметром 3 см (Nunc, США) и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM (Gibco, США) с 16 % сыворотки эмбрионов коров (Hyclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, 25 мг/мл фунгизона и 0,3 мг/мл L-глутамин. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4—7 сут до появления достаточной конfluenceции фибробластов. При достижении необходимого монослоя клетки снимали с подложки с помощью раствора трипсин—ЭДТА и культивировали в чашках Петри в стандартных условиях.

Индукция повреждений ядерной ДНК клеток. ДНК исследуемых клеток повреждали рентгеновским облучением на установке РУМ-17 в дозе 2 Гр или радиомиметиком (блеомицином в концентрации 50—100 мг/мл).

Непрямая иммунофлуоресценция. Визуализации в клетках фосфорилированной формы белка ATM проводили через 30 мин после облучения или через 1 ч от начала экспозиции с блеомицином, длившейся 30 мин.

В качестве контроля использовали интактные клетки. Отмытые от культуральной среды раствором PBS (Биолот, Россия) клетки фиксировали 10 мин в 3.7%-ном растворе формальдегида в PBS на льду, затем продолжали фиксацию в течение 20 мин в 70%-ном этаноле с последующим промыванием в растворе PBS на протяжении 30 мин. Препараты инкубировали 5 мин в 3%-ном растворе Тритона X-100 (Helicon, Россия) на PBS и 30 мин в 1%-ном растворе BSA (Sigma, США), затем промывали раствором PBS.

В качестве первых антител использовали IgG мыши против белка ATM, фосфорилированного по серину в 1981-м положении (Cell Signaling, США), в разведении 1 : 250. В качестве вторых антител использовали козы антимышинные IgG, конъюгированные с ФИТЦ, в разведении 1 : 150 (Sigma-Aldrich Co., США). После инкубации с антителами стекла промывали 30 мин 0.15%-ным раствором Tween-20 (Хеликон, Россия) в PBS. В качестве контроля специфичности иммунной реакции использовали клетки, инкубированные только со вторыми антителами. После окрашивания препараты помещали в раствор пропиленгликоля в 90%-ном глицерине или в антифэйдинге с ДАПИ (Invitrogen, США) для предотвращения быстрого «выгорания» флуоресцентной метки. Для анализа воспроизводимости все тесты проводили по 3 раз и более.

Микроскопию и анализ изображений проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуорофоров был использован аргоновый (488 нм) лазер. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа с помощью компьютера и соответствующего программного обеспечения LSM 5 PASCAL.

Результаты

Выявление протеинкиназы фосфо-АТМ. При окрашивании полученных препаратов антителами к протеинкиназе ATM, фосфорелированной по серину в 1981-м положении, наблюдались закономерные различия между клетками больных АТ и лиц, не страдающих этим заболеванием. Как видно на рисунке, фокусы не образуются в ядрах клеток больных АТ (см. рисунок, *д*, *е*, *н*) после повреждения ионизирующей радиацией в дозе 2 Гр или радиомиметиком блеомицином, т. е. данная протеинкиназа не активна в отличие от клеток донора, не страдающего АТ (см. рисунок, *ж*, *о*). Также фокусы образовывались в клетках больной пигментной ксеродермой (см. рисунок, *л*), больной синдромом Секкеля Ss1SP (см. рисунок, *м*) и больной атаксией, вызванной опухолью мозжечка АТ7SP (см. рисунок, *и*).

Обсуждение

АТ является хорошо изученным синдромом повышенной радиочувствительности у человека. Повышенная радиочувствительность на клеточном уровне описана также у пациентов с Нийменгенским синдромом ломкости хромосом (мутация в гене NBS1), RS-SCID (ген спе-

цифической расщепляющей ДНК-шпильки нуклеазы Artemis), синдромом LIGIV (ген лигазы IV, lig IV), ATLD (AT-like disease, ген RAD50), синдромом Вернера (ген нуклеазы-геликазы WRN), синдромом Ли—Фромени (гетерозиготное носительство мутаций в гене P53). Некоторые из этих генов, такие как P53 и NBS1, являются прямыми мишенями протеинкиназы ATM, другие же принимают участие в процессе репарации двухнитевых разрывов и зависят от активности ATM опосредовано. Интересно, что есть данные о случаях повышенной радиочувствительности клеток больных с синдромами, возникающими при мутациях в генах эксцизионной репарации нуклеотидов, таких как синдром Коккейна и пигментная ксеродерма (Михельсон, Смирнов, 1975; Arlett, Harcourt, 1978; Arlett et al., 1992, 2008). Причина повышенной клеточной радиочувствительности в этих случаях менее очевидна. Для выяснения этой причины крайне интересными представляются полученные нами различия в клеточных паттернах фосфорилирования белка ATM: у здоровых доноров фосфорилированная форма ATM после повреждения ДНК выявляется в ядрах клеток, а у больной пигментной ксеродермой XP2SP — преимущественно в цитоплазме, как это видно на рисунке, *о*. Эти различия в локализации Р-АТМ свидетельствуют о замедлении или нарушении переноса активной молекулы из цитоплазмы в ядро клетки, так как в норме автофосфорилирование происходит в ядре (Lavin, Kozlov, 2007).

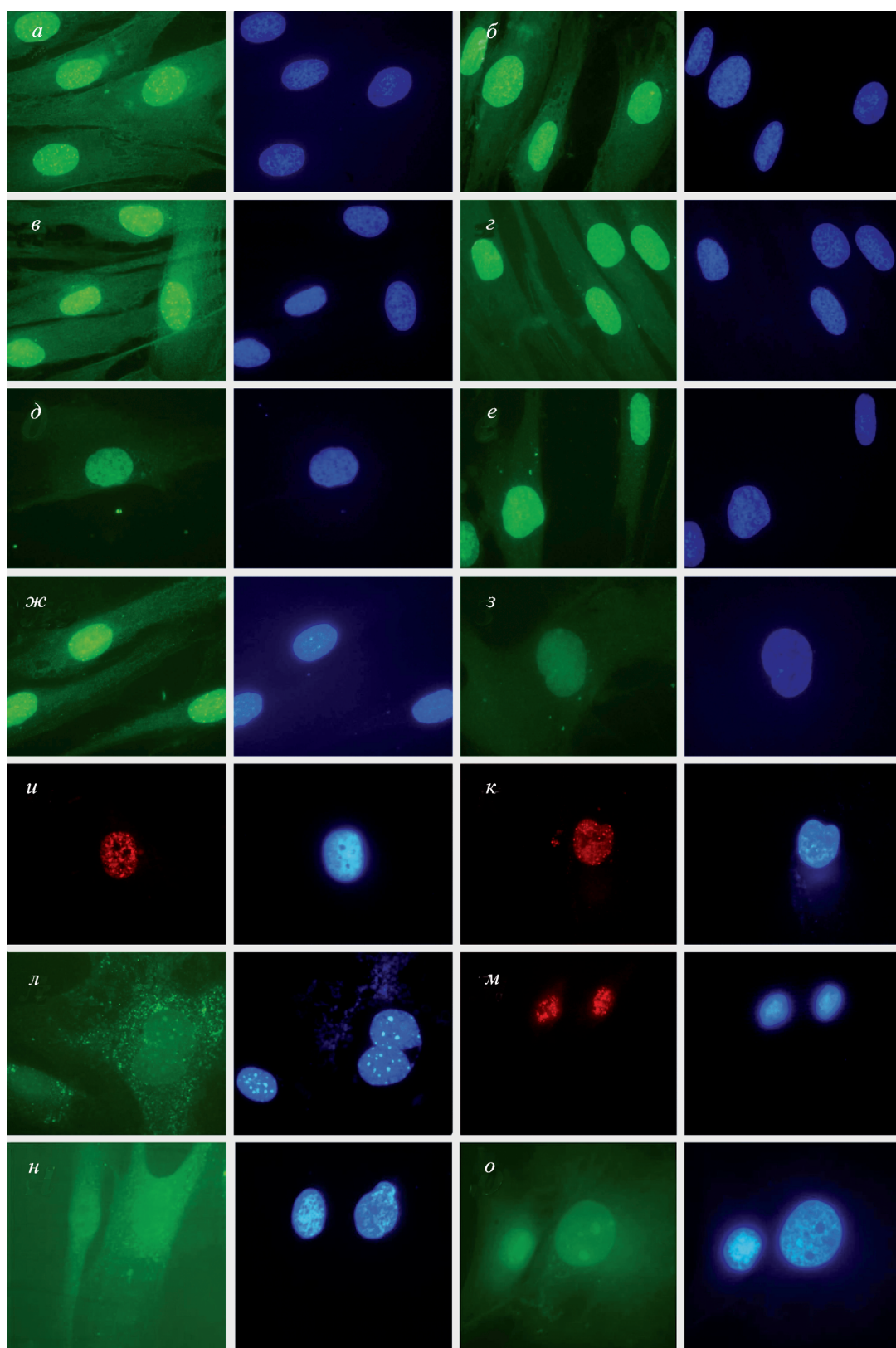
В случае атаксии неясной этиологии (АТ7SP) процесс автофосфорилирования ATM идет так же, как у здорового донора, и фосфо-АТМ локализуется в ядре, хотя процесс репарации ДНК после действия ионизирующей радиации у этого больного замедлен, а количество маркеров старения в клетках повышено (Полуботко и др., 2009а, б): т. е. в обоих этих случаях, несмотря на повышенную клеточную радиочувствительность и даже сопутствующую ей (в случае АТ7SP) атаксию, ген ATM остается функционально активным, тогда как в случае АТ6SP (АТ-вариант, стертая форма течения заболевания) ген ATM неактивен и фосфо-АТМ после действия повреждающих агентов ни в ядре, ни в цитоплазме не выявляется.

Также можно сделать вывод о том, что пациенты P1SP и P2SP с клинической картиной, сходной с АТ, не страдают этим заболеванием (см. рисунок, *а—г*), так как их клеточная реакция в ответ на повреждение схожа с таковой для здоровых лиц. Можно также заключить, что для данного теста в качестве повреждающего агента можно использовать как ионизирующее излучение, так и радиомиметик (блеомицин): фокусы образуются и достаточно отчетливо визуализируются при использовании обоих способов.

Предложенный нами тест может быть использован при необходимости уточнения диагноза АТ в неясных случаях, а также для диагностики заболевания на доклинической стадии, в том числе при проведении инвазивной пренатальной диагностики в семьях больных АТ.

Коллектив авторов благодарит д. м. н., проф. Евгения Наумовича Имянитова и к. м. н. Константина Григорьевича Буслова за помощь в проведении исследований и описании результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00267-а) программы президиума РАН «Фунда-



Наличие фосфорилированной формы белка АТМ, меченной соответствующими антителами, в исследуемых клеточных линиях после облучения в дозе 2 Гр (*а—з*) и воздействия блеомицином (*и—о*).

а, в, д, ж — соответственно клетки P1SP, P2SP, AT8SP и 1SP после облучения в дозе 2 Гр; *б, г, е, з* — соответствующие им интактные клетки; *и—о* — соответственно клетки AT7SP, P2SP, XP2SP, Ss1SP, AT6SP и AT4BR после воздействия 50 мкг/мл блеомицина. Вторые антитела конъюгированы с FITS (зеленый цвет) или родамином (красный цвет). Синий цвет — окраска ядер DAPI. Об. 100×.

ментальные науки — медицине» и в рамках договора о научном сотрудничестве с Украинским институтом клинической генетики Харьковского национального медицинского университета, кафедрой медицинской генетики (ХНМУ) и с Харьковским специализированным медико-генетическим центром от 11 января 2011 г.

Список литературы

- Баренфельд Л. С., Нергадзе С. Г., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 1995. Замедление синтеза ДНК в смежных кластерах репликационных в лимфоцитах больных синдромом Дауна как модели преждевременного старения. Цитология. 37 (9-10): 900—904.
- Каламкарян А. А., Шадиев Х. К. 1984. Прогностическое значение паранеопластических дерматозов. Вестн. дерматол. венерол. 4 : 4—8.
- Куранова М. Л., Спивак И. М. 2011. Эпигенетические изменения при атаксии-телеангиэктазии. Науч. тех. вед. СПбГПУ. 3 (130) : 252—256.
- Михельсон В. М., Смирнов В. С. 1975. Генетическая гетерогенность пигментной ксеродермы. Вестн. дерматол. венерол. 3 : 70—75.
- Полуботко Е. А., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Михельсон Н. М., Спивак И. М. 2009а. Особенности преждевременного старения при атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 51 (8) : 712—718.
- Полуботко Е. А., Шатрова А. Н., Плескач Н. М., Михельсон В. М., Спивак И. М. 2009б. Клеточный репаративный потенциал в семях больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 52 (12) : 978—985.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5) : 338—379.
- Спивак И. М., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Ледащцева Т. А., Михельсон В. М. 2005. Особенности стабилизации белка p53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после гамма-облучения. Цитология. 47 (10) : 898—906.
- Спивак И. М., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Ледащцева Т. А., Михельсон В. М. 2007. Дискриминация гетерозиготного носительства атаксии-телеангиэктазии методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Цитология. 49 (1) : 55—61.
- Хомасуридзе М. М., Спивак И. М., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 1999. Особенности радиочувствительности клеток больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 41 (5) : 412—419.
- Arlett C. F., Green M. H. L., Roges P. B., Lehmann A. R., Plowman P. N. 2008. Minimal ionizing radiation sensitivity in a large cohort of xeroderma pigmentosum fibroblasts. Br. J. Radiol. 81 (961) : 51—58.
- Arlett C. F., Harcourt S. A. 1978. Cell killing and mutagenesis in repair-defective human cells. In: DNA repair mechanisms. Academic Press. 550 p.
- Arlett C. F., Harcourt S. A., Cole J., Green M. H. L., Anstey A. V. 1992. A comparison of the response of unstimulated and stimulated T-lymphocytes and fibroblasts from normal, xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy donors to the lethal action of UV-C. Mutat. Res. 273 (2) : 127—135.
- Bakkenist C. J., Kastan M. B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature. 421 (6922) : 499—506.
- Boder E., Sedgwick R. P. 1958. Ataxia telangiectasia: a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. Pediatrics. 21 (4) : 526—554.
- Burdon D., Patek R., Charlliss R. A. J., Blank J. L. 2002. Growth inhibition by the muscarinic M3 acetylcholine receptor: evidence for p21Cip1/Waf1 involvement in G₁ arrest. Biochemistry. 367 : 549—555.
- Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. Nat. Genet. 32 (1) : 89—90.
- Falck J., Mailand N., Syljuasen R. G., Bartek J., Lukas J. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature. 410 (6830) : 842—847.
- Kutagawa R., Kastan M. B. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol. 70 : 99—109.
- Kruse J. P., Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. Cell. 137 (4) : 609—622.
- Lanzu G., Ballotin U., Franciotta D., Maserati E., Pasquali F., V., Veggiotti P. 1992. Clinical, cytogenetic and immunological aspects in 4 cases resembling ataxia telangiectasia. Eur. Neurol. 32 3121—125.
- Lavin M. F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Mol. Cell. Biol. 9 (12) : 759—769.
- Lavin M. F., Khanna K. K. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. Int. J. Radiat. Biol. 75 (10) : 1201—1214.
- Lavin M. F., Kozlov S. 2007. ATM activation and DNA damage response. Cell Cycle. 6 (8) : 931—942.
- Lee J. H., Mand M. R., Deshpande R. A., Kinoshita E., Yang S. H., Wiman C., Paull T. T. 2013. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the MRE11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex. J. Biol. Chem. 288 (18) : 12 840—12 851.
- Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Murray D. 2012. New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. J. Biomed. Biotechnol. 17 (3) : 25—29.
- 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 (4) : 497—501.
- Pulverer B. 2003. ATM Machine. Nat. Cell Biol. 5 (2) : 96.
- Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dörkl Th., Bendix R., Skwaran B., Stuhmann M., Wegner R. D., Sperling K., Banin Sh., Shiloh Yo., Baumer A., Bernthaler U., Sennfelder H., Brohm M., Weber B. H. F., Schindler D. 1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. Hum. Mol. Genet. 8 (1) : 69—79.
- Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad Sh., Rotman G., Ziv Ya., Vanagaite L., Tagle D. A., Smith S., Uziel T., Stez Sh., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S. R., Simmons A., Clines G. A., Sartiel 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 Sh. M., Lovett M., Collins F. S., Shiloh Yo. 1995. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to P1-3 kinase. Science. 268 (5218) : 1749—1753.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nature. 3 (3) : 155—168.
- Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B., Andreassen P. R., Gregory R. C., Kim S. T., Lane W. S., Katsan M. B., D'Andrea A. D. 2002. Convergence of the Fanconi anemia and ataxia telangiectasia signaling pathways. Cell. 109 (4) : 459—472.
- Taylor A. M. 1978. Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. Mutat. Res. 50 (3) : 407—418.
- Westphal C. H. 1997. Cell-cycle signaling: Atm displays its many talents. Curr. Biol. 7 (12) : R789—R792.
- Xu B., O'Donnell A. H., Kim S. T., Kastan M. B. 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brca 1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. Cancer Res. 62 (16) : 4588—4591.
- Yazdi P. T., Wang Y., Zhao S., Patel N., Lee E. Y., Qin J. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. Genes Develop. 16 (5) : 571—582.
- Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. 2010. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. J. Biol. Chem. 285 (38) : 29 662—29 670.

DIAGNOSTICS OF ATAXIA-TELANGIECTASIA BY THE EXPRESS-TEST FOUND
ON THE METHOD OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE

*M. L. Kuranova,^{1,4} T. A. Ledashcheva,² E. K. Tulush,² D. L. Belyaev,³ S. V. Zherebtsov,¹
N. M. Pleskach,¹ V. V. Prokofieva,¹ V. M. Mikhelson,¹ I. M. Spivak¹*

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ² St. Petersburg Diagnostic (Medico-Genetical) Centre,
³ St. Petersburg State University and ⁴ St. Petersburg Polytechnic University;
¹ e-mail: miryakuranova@gmail.com

Ataxia-telangiectasia (AT) is a hereditary severe neurodegenerative disease developing, when mutations take place in both alleles of the *atm* gene, which encodes the key protein of the cellular response to DNA damage (DDR) — ATM proteinkinase. In response to the occurrence of double-strand DNA breaks, the ATM proteinkinase pass the autophosphorylation, and its active form — the phospho-ATM (P-ATM) appears in cells. In the nuclei of cells having the *atm* gene, P-ATM is revealed, being absent in cells with mutated forms of this gene, by means of the application of the modified method of indirect immunofluorescence. This peculiarity may be applied in the clinic, in order to confirm the diagnosis of AT.

Key words: ataxia-telangiectasia, *atm* gene, immunofluorescence, proteinkinase ATM.
