

УДК 577.214:57.052

**ВЛИЯНИЕ ПРОЦЕССА ТРАНСКРИПЦИИ НА ОБРАЗОВАНИЕ ДВОЙНЫХ РАЗРЫВОВ ПРИ  
ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОЙ ФРАГМЕНТАЦИИ ДНК****Колотова Т.Ю.****Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины. г. Харьков. Украина**

В ядре хроматин находится в конденсированном состоянии, которое обеспечивается несколькими уровнями компактизации ДНК. Наиболее изученной является укладка ДНК в виде нуклеосом. Последние, в свою очередь, образуют фибриллы размером 30 нм. Следующим уровнем компактизации, как предполагается, является присоединение хроматина к ядерному матриксу, в результате чего образуются петли ДНК или топологические домены [1]. Доменный уровень организации хроматина поддерживается посредством взаимодействия специфических последовательностей ДНК, называемых матрикс-ассоциированными районами, с белками ядерного матрикса [2].

При апоптозе или запрограммированной гибели клеток образуются два типа фрагментов: высокомолекулярные, которые появляются на ранних стадиях апоптоза, и межнуклеосомные. Высокомолекулярные фрагменты образуют два пика в районе 50 и 300 т.п.н при разделении ДНК апоптотических клеток в пульсирующем электрическом поле [3]. Иногда выявляются более сложные паттерны, например, описано такое распределение фрагментов: более 1000 т.п.н., 450-600 т.п.н. и 30-50 т.п.н. [4].

Межнуклеосомная фрагментация отражает первичный уровень укладки хроматина в виде нуклеосом. Оказалось, по крайней мере в некоторых случаях, что образующиеся в ходе распада ДНК высокомолекулярные фрагменты также соответствуют определенному уровню компактизации хроматина, а именно, петлям ДНК и розеткам. Так, молекулярная масса содержащих гены *c-myc* и рРНК фрагментов ДНК, выделенных из апоптотических клеток, равна молекулярной массе содержащих эти же гены топологических доменов, полученных при расщеплении ДНК топоизомеразой II [5]. Известно, что топоизомераза II расщепляет ДНК у основания топологических доменов.

Поскольку высокомолекулярная фрагментация в основном изучалась при апоптозе клеток, то было сделано предположение, что это процесс необратимого распада ДНК [3]. А факт, что такой же вид фрагментации наблюдается при некоторых формах некроза, подтверждал необратимость и свидетельствовал о неспецифичности распада. Однако ряд данных противоречит этому заключению.

Так, обработка клеток линии U937 перекисью водорода, который вызывает окислительный стресс и апоптоз, приводит к обратимому образованию высокомолекулярных фрагментов ДНК [7]. Однако если воздействие стрессового фактора продлевается, то за первой стадией обычно следует необратимая высокомолекулярная фрагментация, параллельно начинается и межнуклеосомная фрагментация. Дальнейшие исследования позволили предположить, что превращение обратимых разрывов в необратимые происходит при транскрипции тех локусов, в которых образуется ковалентный комплекс между топоизомеразой II и ДНК [7]. Вероятно, столкновение образуемого топоизомеразой II ковалентного комплекса с белковым комплексом элонгации транскрипции вызывает арест транскрипции, присоединение к топоизомеразе II убиквитина и последующий протеолиз топоизомеразы, в результате чего высвобождаются концы ДНК и образуются двойные разрывы, реparable

гомологичной рекомбинацией или системой соединения негомологичных концов [8]. Когда концы не репарируются, индуцируется апоптоз.

Если такой сценарий справедлив, то транскрипция не нужна для образования двойных разрывов ДНК и в целом для первой обратимой стадии фрагментации, но она необходима для превращения обратимых разрывов в необратимые. Но нельзя исключить возможность того, что процесс транскрипции нужен и для самого образования двойных разрывов. Поскольку в результате транскрипции происходят эпигенетические модификации хроматина, то это может делать его более доступным для действия нуклеаз или топоизомеразы II. Более того, показано, что топоизомераза II необходима для транскрипции [9]. А это означает, что в процессе транскрипции происходит временное нарушение интегральности ДНК, и образуются двойные разрывы. Следовательно, так как при апоптозе, стрессе, дифференцировке перепрограммируется транскрипция ряда генов, причем процессы активации транскрипции преобладают над процессами подавления [10], то может происходить временное увеличение формирования обратимых двойных разрывов. Лизис клеток с применением детергента додецилсульфата Na позволяет фиксировать как обратимые, так и необратимые двойные разрывы [11], что позволяет применить этот метод для поиска той фрагментации, которая отражает дезинтеграцию, вызываемую метаболизмом ДНК.

Действительно, фрагментация выявляется не только при апоптозе, но и в результате действия стрессовых факторов и индукции дифференцировки клеток, т.е. в условиях массового перепрограммирования активности генов. Так, в клеточных линиях при их культивировании в стрессовых условиях (например, голодание по аминокислотам, контактное ингибирование) обнаружены высокомолекулярные фрагменты [12, 13]. После прекращения стрессового воздействия фрагменты быстро исчезают, но количество мертвых клеток в культуре не увеличивается и составляет 1-2% [12]. Впервые указания на то, что дезинтеграция и образование высокомолекулярных фрагментов ДНК может иметь физиологическое значение и отражать транскрипционную активность генов, были получены в работе Elias L. и Berry C.O., которые показали, что в результате разделения пульс-электрофорезом ДНК, выделенной из дифференцирующихся клеток HL-60, выявляются фрагменты размером 200-400 т.п.н [7]. Фрагменты, образующиеся при дифференцировке клеток линии HL-60, гибридизуются с пробой к гену *c-myc*, транскрипция которого меняется при дифференцировке, но не с пробой к контрольным генам, которые не транскрибируются, что свидетельствует о неслучайном характере фрагментации и о том, что образование двойных разрывов, возможно, отражает функциональную активность локуса. Установлено также, что *in vivo* дифференцировка по крайней мере нейронов сопровождается образованием двойных разрывов ДНК, и если такие разрывы не репарируются клетки гибнут путем апоптоза [14]. Таким образом, высокомолекулярная фрагментация может происходить и в геноме неапоптозных клеток, и, как можно предположить на основании ее усиления при стрессе и дифференцировке, сопутствовать изменению паттерна экспрессируемых генов.

В целом же до настоящего времени связь между транскрипцией и фрагментацией ДНК остается достаточно противоречивой. Поэтому в данном исследовании предпринята попытка уточнить механизмы зависимости высокомолекулярной фрагментации от процесса транскрипции.

## Материалы и методы

*Клеточные линии и условия их культивирования.* Для исследования фрагментации ДНК использовались культивируемые клетки лимфобластомы человека (линия СЕМ), HeLa и клетки тимуса, взятые от мышей в возрасте 4-5 недель (линия BALB/c). Культивируемые клетки человека инкубировались в среде RPMI 1640,

содержащей 10% фетальную сыворотку телят (FSC) и антибиотики пенициллин-стрептомицин, в CO<sub>2</sub> инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>), до достижения концентрации клеток 1-10<sup>7</sup> кл/мл. Для приготовления первичной культуры тимоцитов использовался тимус мышей, концентрацию клеток доводили до 1-10<sup>7</sup> кл/мл в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FSC сыворотки. Клетки тимуса инкубировали в течение 6 часов в CO<sub>2</sub> инкубаторе при описанных выше условиях либо только с индуктором апоптоза дексаметазоном (1 мкМ), либо с дексаметазоном и добавлением ингибиторов синтеза белков и РНК. Использовался актиномицин D - ActD фирмы Sigma-Aldrich в концентрации 30 мкг/мл и циклогексимид - CHX (Sigma-Aldrich), который добавлялся в среду с расчетом, что конечная концентрация препарата будет достигать 10 мкг/мл. Ингибиторы макросинтеза добавлялись вместе с дексаметазоном. Жизнеспособность клеток оценивалась с помощью трипанового синего.

*Анализ фрагментации ДНК.* 200 мкл. интактных клеток тимуса помещались в лунки 24 ячеечного планшета и заливались равным объемом 1% легкоплавкой агарозы растворенной в TEN буфере. После застывания клеток в агарозе к препарату добавлялось 400 мкл. лизирующего буфера (20 mM трис-НСl, pH 7.5, 20 mM EDTA и 1% SDS). Препарат помещался на 37° С. Образцы Легкоплавкая агароза, содержащая депротеинизированную ДНК, помещались в 1% агарозный гель и подвергались либо обычному электрофорезу, либо пульс-электрофорезу в инверсионном поле - FIGE.

*Электрофорез в агарозном геле.* Для определения паттерна расщепления ДНК препараты лизированных клеток подвергали электрофорезу в постоянном поле или пульс-электрофорезу в инверсионном поле. Обычный электрофорез проводился в 1, 4% агарозе при напряжении 50 V на протяжении 4-5 часов с использованием 0,5×TBE буфера (0,089 M трис-бората, 0,089 M борной кислоты, 0,002 M EDTA). FIGE электрофорез проводился в 1% агарозном геле при напряжении 85 V, в течение 18 часов в 0,5×TBE буфере при постоянной пульсации электрического поля 24 сек вперед и 8 сек назад, что позволяло разделить молекулы ДНК размером до 300 т.п.н. В некоторых случаях FIGE проводился в течение 5-6 часов, что позволяло разделить как межнуклеосомные, так и высокомолекулярные фрагменты ДНК. После электрофореза гель окрашивали этидиум бромидом, просматривали с помощью ультрафиолетового трансиллюминатора и фотографировали.

*Блотинг и гибридизация ДНК.* После электрофореза ДНК денатурировали в нескольких объемах раствора, содержащего 1,5 NaCl и 0,5 NaOH в течение 1 ч., при комнатной температуре с постоянным перемешиванием. Нейтрализацию проводили раствором, содержащим 1 M трис-НСl pH 8,0 и 1,5 M NaCl, в течение 1 ч., после чего фрагменты ДНК переносили на нитроцеллюлозные фильтры в течение 24 ч. методом капиллярного переноса. Иммуобилизовали ДНК на фильтрах с помощью ультрафиолетовой лампы БУВ-15 в течение 20 с. Предгибридизацию проводили в течение 10 часов, а гибридизацию в течение 15 часов при температуре 65°С в следующем растворе: 5×SSPE (SSPE - 0,18 M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4, 1 mM ЭДТА) 5× раствор Денхардта (100 мг фикола, 100 мг поливинилпирролидона, 100 бычьего сывороточного альбумина, H<sub>2</sub>O до 100 мл), 0,5% додецилсульфата Na, 200 мкг/мл денатурированной ДНК из спермы лосося. ДНК гибридизовали с меченым радиоактивным фосфором <sup>32</sup>P клонированным фрагментом ДНК человеческого гена с-тус. После гибридизации ДНК фильтры промывались дважды по 30 мин при 65°С в 2×SSPE - 0.1% SDS и один раз (30 мин) в 0.1×SSPE-0.1% SDS. После этого фильтр высушивали и проводили радиоавтографию с рентгеновской пленкой.

### Результаты и обсуждение

Апоптоз тимоцитов, вызываемый глюкокортикоидами, зависит от транскрипции и трансляции, что свидетельствует о необходимости синтеза белков *de novo* для запуска программы клеточной гибели. Как показано на рисунке 1, индуцированный дексаметазоном апоптоз в первичной культуре лимфоцитов сопровождается нарастанием образования высокомолекулярных фрагментов ДНК, а к 4-6 часам появляется и межнуклеосомная фрагментация, выявляемая электрофорезом в постоянном электрическом поле. Ингибитор белкового синтеза циклогексимид несколько снижает высокомолекулярную фрагментацию ДНК, но при этом полностью подавляет межнуклеосомную фрагментацию, что свидетельствует о независимости в тимocyитах высокомолекулярной фрагментации от синтеза белка *de novo* в отличие от межнуклеосомной фрагментации.

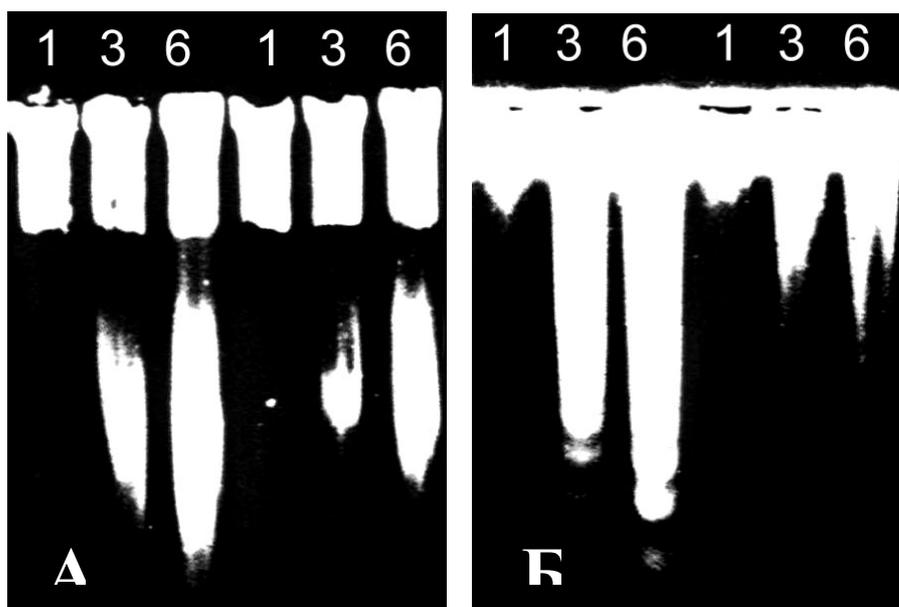


Рисунок 1. Влияние ингибитора синтеза белка циклогексимида на апоптоз тимоцитов, вызываемый глюкокортикоидами. А. Пульс-электрофорез лизированных и заключенных в легкоплавкую агарозу тимоцитов, обработанных дексаметазоном и циклогексимином. В Электрофорез в постоянном поле лизированных и заключенных в легкоплавкую агарозу тимоцитов, обработанных дексаметазоном и циклогексимином. Время инкубации указано сверху.

Для того чтобы выявить связь между процессом транскрипции и дезинтеграцией ДНК изучалось влияние ингибитора транскрипции и синтеза РНК актиномицина D на процесс апоптоза в тимocyитах, обработанных дексаметазоном. Актиномицин D является интеркалятором, который размещается в промежутках между соседними парами оснований и ингибирует присоединение РНК-полимеразы к матрице ДНК и/или элонгацию транскрипции.

Данные, представленные на втором рисунке, показывают, что межнуклеосомная фрагментация полностью подавляется актиномицином D. В то же время актиномицин D, в отличие от циклогексимида, значительно подавляет и высокомолекулярную фрагментацию ДНК. Однако к 4 часу с момента индукции апоптоза появляется незначительная высокомолекулярная фрагментация, которая сохраняется, но не нарастает на протяжении оставшегося времени инкубирования клеток.

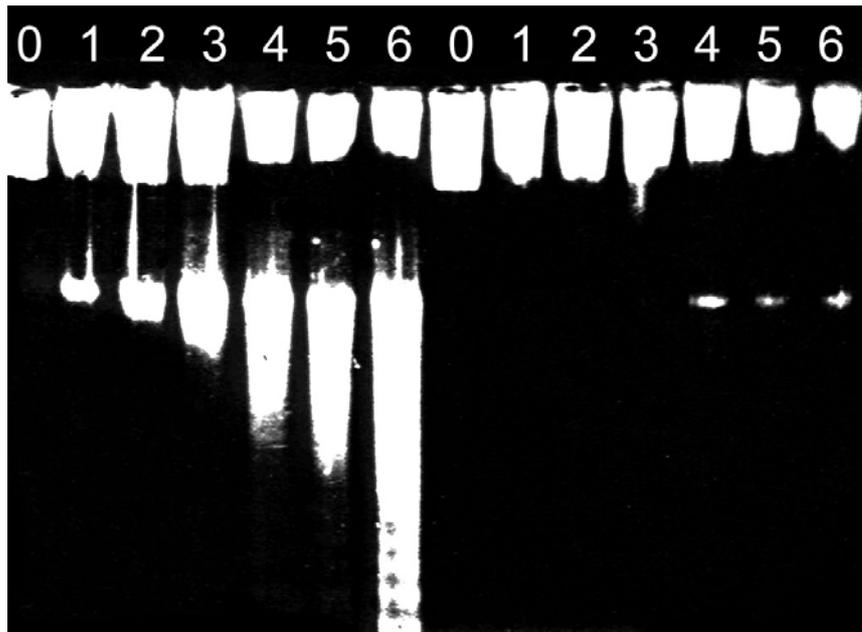


Рисунок 2. Влияние ингибитора транскрипции актиномицина D на апоптоз тимоцитов, вызываемый глюкокортикоидами. Пульс-электорофорез лизированных и заключенных в легкоплавкую агарозу тимоцитов, обработанных дексаметазоном и актиномицином D, который добавляли одновременно с глюкокортикоидами. Время инкубации указано сверху.

Таким образом, условия образования тех двойных разрывов ДНК, которые индуцируют высокомолекулярную фрагментацию, и тех, которые приводят к межнуклесомной фрагментации, различаются. Если исходить из предположения о том, что высокомолекулярная фрагментация является первым этапом деградации ДНК, а образовавшиеся на первой стадии высокомолекулярные фрагменты, вследствие перехода хроматина в открытое состояние, становятся доступными для действия эндонуклеаз, то различие требований к трансляции и транскрипции двух типов фрагментации является достаточно неожиданным. Видимо, межнуклеосомная фрагментация не является автоматическим продолжением деградации ДНК, инициируемой высокомолекулярной фрагментацией.

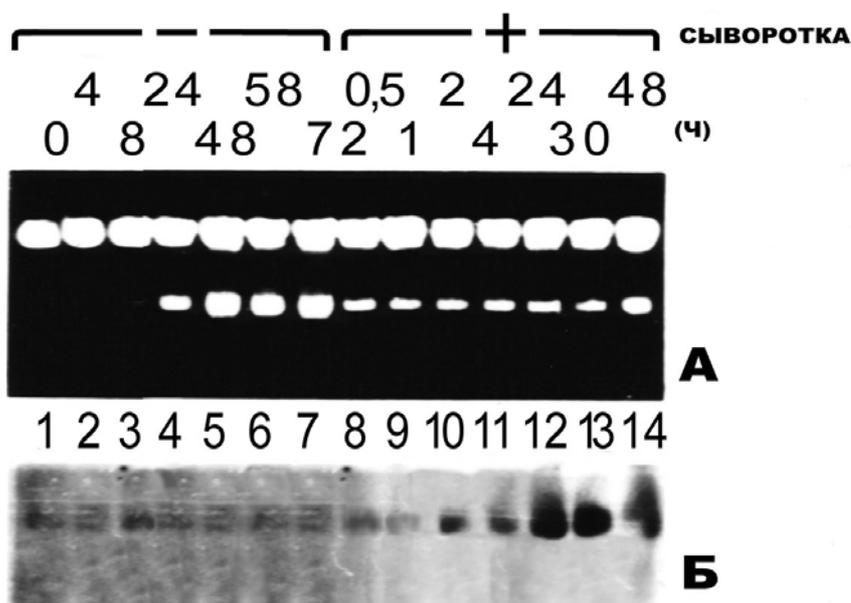
Снижение высокомолекулярной фрагментации ДНК при подавлении синтеза РНК позволяет предположить зависимость фрагментации либо от вновь синтезированных молекул РНК, либо зависимость фрагментации от самого процесса транскрипции. Первое предположение нельзя полностью исключить, но оно является маловероятным, поскольку молекулы РНК являются матрицей для синтеза белка, но фрагментация не зависит от синтеза белка *de novo*. Поэтому представляется более предпочтительным второе предположение, которое сводится к зависимости фрагментации от самого процесса транскрипции.

Поскольку применяемая методика позволяет фиксировать как обратимые, так и необратимые разрывы ДНК, то полученные результаты позволяют предположить, что при индукции апоптоза дексаметазоном в тимоцитах мышей транскрипция необходима не только для перевода обратимых разрывов в необратимые, о чем свидетельствуют данные Mao et al [8], но и для образования обратимых двойных разрывов. Однако следует еще раз подчеркнуть, нельзя полностью исключить, что для формирования двойных разрывов нужна образуемая в ходе транскрипции РНК.

Далее, представлены результаты исследования динамики распределения гена *c-myc* между интегральной ДНК и высокомолекулярными фрагментами при ингибировании пролиферации клеток линии СЕМ лимфобластомы человека в результате старения и последующей активации пролиферации ДНК при добавлении сыворотки. Известно, что экспрессия гена *c-myc* активируется в условиях, индуцирующих пролиферацию клеток, и подавля-

ется при ингибировании пролиферации. Если предположить, что транскрипция способствует образованию двойных разрывов, то перераспределение доменов между фракциями ДНК должно отражать изменение транскрипционного состояния гена *c-myc*, а не нарастание образования высокомолекулярных фрагментов в условиях стресса, что удалось пронаблюдать в эксперименте.

На рисунке 3 представлены результаты, полученные при разделении клеток линии СЕМ, которые инкубировались в течение 72 часов в среде, не содержащей сыворотку, а затем в течение 48 часов с добавлением сыворотки. Как показано на рисунке происходит дезинтеграция ДНК при старении клеток СЕМ линии, что проявляется в формировании высокомолекулярных фрагментов ДНК. Но формирование высокомолекулярных фрагментов при старении СЕМ клеток, в отличие от наблюдаемого во время апоптоза тимоцитов, носит временный характер, и при добавлении сыворотки происходит резкое снижение фрагментации. Это снижение не связано с тем, что часть клеток гибнет путем апоптоза, поскольку доля мертвых клеток, определяемая окрашиванием трипановым синим, на протяжении всего периода культивирования клеток остается постоянной и не превышает 1-2%.



**Рисунок 3.** Динамика образования высокомолекулярных фрагментов и локализации гена *c-myc* в культивируемых СЕМ клетках. А) Временный характер образования высокомолекулярных фрагментов ДНК в культивируемых клетках линии СЕМ в условиях стресса. Клетки инкубировались в среде, не содержащей сыворотки (-), в течение времени, указанного сверху (ч). После 24 часов инкубирования добавлялась сыворотка и клетки продолжали инкубироваться в содержащей сыворотку среде (+) в течение времени, указанного сверху. На протяжении времени инкубации суспензия клеток заключалась в агарозу, обрабатывалась 1% SDS и подвергалась FIGE электрофорезу.

Б) Релокализация гена *c-myc* между интегральной и дезинтегрированной ДНК в культивируемых клетках линии СЕМ, взятых до и после старения. После пульс-электрофореза фрагменты ДНК переносили на нитроцеллюлозный фильтр и подвергали гибридизации с меченой  $^{32}\text{P}$  пробой к гену *c-myc*

После пульс-электрофореза лизированных клеток СЕМ линии, гель, содержащий высокомолекулярные фрагменты, подвергали блотингу, в результате которого фрагменты ДНК переносились на нитроцеллюлозные фильтры. Затем фрагменты подвергали гибридизации с меченой радиоактивным  $^{32}\text{P}$  пробой к гену *c-myc*. На рисунке 3Б представлены результаты гибридизации. Очевидно, что нарастание дезинтеграции ДНК не сопровож-

дается увеличением содержания среди фрагментов тех топологических доменов, в которых находится ген *c-myc*. В то же время добавление сыворотки приводит к постепенному снижению образования высокомолекулярных фрагментов, но количество фрагментов, содержащих ген *c-myc*, наоборот, возрастает.

Как известно, в условиях старваии происходит подавления пролиферации клеток, в то же время добавление сыворотки индуцирует пролиферацию. Ген *c-myc* является геном немедленного ответа, активация которого вызывает деление клеток. Транскрипция *c-myc* усиливается под действием факторов, индуцирующих деление клетки. Поэтому можно предположить, что переход топологического домена, содержащего ген *c-myc*, в высокомолекулярную фракцию, отражает процесс активации транскрипции гена *c-myc*.

Таким образом, представленные на рисунке 3 данные могут свидетельствовать о том, что обратимая высокомолекулярная фрагментация ДНК появляется при увеличении транскрипции ряда генов, активация которых происходит при голодании СЕМ клеток.

Итак, в совокупности полученные результаты: подавление актиномицином D высокомолекулярной фрагментации при индукции дексаметазоном апоптоза в тимocyтах, временный характер образования высокомолекулярных фрагментов в условиях стресса, свидетельствующий об обратимости фрагментации и, вероятно, связи с метаболизмом ДНК, перераспределение топологических доменов, содержащих ген *c-myc*, между фракцией интегральной и фрагментированной ДНК, подтверждают предположение о том, что транскрипция нужна не только для превращения обратимых двойных разрывов в необратимые, но и для образования самих двойных разрывов и высокомолекулярной фрагментации ДНК.

В то же время, имеющиеся данные остаются достаточно неполными, и требуются дальнейшие исследования для более точного понимания связи между фрагментацией и процессами метаболизма ДНК.

### Список литературы

1. Mirkovitch J., Mirault M. E., Laemmli U. K. Organization of the higher order chromatin loops: specific DNA attachment site on nuclear scaffold // *Cell*. - 1984. - Vol. 39. - P. 223-232.
2. Jackson, D. A., Dolle, A., Robertson, G., and Cook, P. R. The attachment of chromatin loops to the nucleoskeleton // *Cell. Biol. Int. Rep.* - 1992. - Vol. 16. - P. 687-696
3. Brown D., Sun X., Cohen G. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation // *J. Biol. Chem.* - 1993. - Vol. 268. - P. 3037-3039.
4. Rusnak J., Calmels T., Hoyt D. Genesis of discrete higher order DNA fragments in apoptotic human prostatic carcinoma cells. // *Mol. Pharmacol.* - 1996. - Vol. 16. - P. 191-198.
5. Lagarkova M., Iarovaya O., Razin S. Large-scale fragmentation of mammalian DNA in the course of apoptosis proceeds via excision of chromosomal DNA loops and their oligomers // *J. Biol. Chem.* - 1995b. - Vol. 270. - P. 20239 - 20241.
6. Li T-S, Chen A., Yu C., Mao Y., Wang H., Liu L. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress // *Genes Dev.* - 1999. - Vol. 13. - P. 1553-1560.
7. Elias L., Berry C. Induction of differentiation by tumour necrosis factor in HL-60 cells is associated with the formation of large DNA fragments // *Leukemia*. - 1991. - V. 5. - P. 879-885.
8. Mao Y., Desai S., Ting C-Y., Hwang J., Liu L. 26 S Proteasome-mediated Degradation of Topoisomerase II Cleavable Complexes. // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276. - P. 40652-40658.

9. Mondal N, Parvin JD. DNA topoisomerase II $\alpha$  is required for RNA polymerase II transcription on chromatin templates // *Nature*. - 2001. - Vol. 413. - P. 435-438.
10. Chiang L.W., Grenier J. M., Ettwiller L., Jenkins L. P., Ficenc D., Martin J., Jin F., DiStefano P.S., Wood A. An orchestrated gene expression component of neuronal programmed cell death revealed by cDNA array analysis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* - 2001. - Vol. 98. - P. 2814-2819.
11. Razin S.V., Gromova I.I., Iarovaia O.A. Specificity and functional interaction with the nuclear matrix: new approaches to clarify the old questions // *Int. Rev. Cytol.* - 1995. - Vol. 162B. - P. 405-448.
12. Solov'yan V., Andreev I., Kolotova T., Pogribniy P., Tarnavsky D., Kunakh V. The Cleavage of nuclear DNA into high molecular weight DNA fragments occurs not only during apoptosis but also accompanies changes in functional activity of the nonapoptotic cells // *Exp. Cell. Res.* - 1997. - Vol. 235. - P. 1230-1237.
13. Solovyan V., Andreev I., Kolotova T., Pogribniy P., Tarnavsky D. Ordered nuclear DNA desintegration as a specific genome reaction accompanying apoptosis, stress responses and differentiation // *Биополимеры и клетка*. - 1996. - Т. 12. - С. 67-76.
14. Gao Y., Sun Y., Frank K.M., Dikkes P., A Critical Role for DNA end-Joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis // *Cell*. - 1998. - Vol. 95. - P. 891-902.

#### **Влияние процесса транскрипции на образования двойных разрывов при высокомолекулярной фрагментации ДНК**

**Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины.**

В работе представлены результаты изучения высокомолекулярной фрагментации ДНК при апоптозе в первичной культуре мышинных тимоцитов и при старении клеток линии СЕМ лимфобластомы человека. Исследована зависимость высокомолекулярной фрагментации ДНК тимоцитов, вызываемой дексаметазоном, от ингибиторов транскрипции и трансляции циклогексимида и актиномицина D. Подавление высокомолекулярной фрагментации актиномицином D позволило предположить зависимость образования двойных разрывов ДНК, вызывающих появление высокомолекулярных фрагментов, от транскрипции. Старение клеток линии СЕМ индуцирует образование высокомолекулярных фрагментов, которые быстро исчезают при добавлении сыворотки. Паттерн распределения топологических доменов, содержащих ген c-myc, между фрагментированной и интегральной ДНК во время и после старения подтверждает вероятную связь между транскрипцией и фрагментацией.

#### **Вплив процесу транскрипції на утворення подвійних розривів при високомолекулярній фрагментації ДНК**

**Інститут мікробіології й імунології ім. І.І. Мечникова АМН України.**

У роботі представлені результати вивчення високомолекулярної фрагментації ДНК при апоптозі в первинній культурі мишачих тимоцитів і при старенні клітин лінії СЕМ лімфобластоми людини. Досліджено залежність високомолекулярної фрагментації ДНК тимоцитів, викликуваної дексаметазоном, від інгібіторів транскрипції і трансляції циклогексимида та актиномицину D. Придушення високомолекулярної фрагментації актиномицином D дозволило припустити залежність утворення подвійних розривів ДНК, що викликають появу високомолекулярних фрагментів, від транскрипції. Старення клітин лінії СЕМ індукує утворення високомолекулярних фрагментів, що швидко зникають при додаванні сироватки. Патерн розподілу топологічних доменів, що містять ген c-myc, між фрагментами та інтегральною ДНК під час і після старення підтверджує ймовірний зв'язок між транскрипцією і фрагментацією.

#### **Association between transcription and double-strand breaks formation during high molecular weight DNA fragmentation**

**Mechnikov's Institute of Microbiology and Immunology of Ukrainian Medicine Academy. Kharkov. Ukraina**

In this work the results of study of DNA cleavage into high molecular weight fragments in murine thymocytes and human lymphoblastoma cells (line CEM) have been summarised. It has been revealed the influence of inhibitors of

RNA and protein synthesis actinomycin D and cyclogeximid on the high molecular weight DNA fragmentation. The inhibition of high molecular weight fragmentation in thymocytes by actinomycin D confirmed the supposition about the requirement of transcription for the DNA disintegration. Moreover the distribution pattern of topological domains containing c-myc between cleavable and uncleavable DNA fraction in CEM cell during and after starvation reflects the transcriptional activity of the gene.