

АНАЛИЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ДИНАМИКИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ НА ЕГО РАЗЛИЧНЫХ ФАЗАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОНИЗОВАННЫХ КЛЕТОК

Обзор

© 2004 г. Р.Э. Узбеков

Группа «Клеточный цикл» Отдела электронной микроскопии
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова,
119992 Москва; факс: (7-095)939-3181, электронная почта: rustuzbekov@aol.com

Поступила в редакцию 18.06.03

После доработки 15.09.03

Исследование динамики уровня экспрессии белков в клеточном цикле требует получения достаточно чистых фракций клеток различных его фаз, для чего были разработаны методы синхронизации клеток. В свою очередь успешная синхронизация клеток невозможна без знания продолжительности всех фаз клеточного цикла. Эти обстоятельства обусловили совместное рассмотрение данных вопросов в предлагаемом обзоре. В первой части кратко изложены основные методы анализа продолжительности стадий клеточного цикла. Во второй части обзора суммированы данные о воздействиях используемых для синхронизации клеток. Третья часть обзора посвящена рассмотрению методов расчета процентного содержания клеток различных фаз клеточного цикла во фракциях синхронизованных клеток. В четвертой части рассмотрена методика изучения уровня экспрессии различных белков в клеточном цикле с помощью количественного иммуноблоттинга фракций синхронизованных клеток. Изложенные в обзоре общетеоретические положения проиллюстрированы в Приложении конкретными примерами анализа клеточного цикла, синхронизации и изучения динамики уровня экспрессии в клеточном цикле некоторых белков, проведенном на синхронизованных клетках линии XL2 (*Xenopus laevis*).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: клеточный цикл, белки, синхронизация клеток.

Ядро начали изучать ранее других клеточных органелл, поэтому исторически сложилось так, что понятия «клеточный цикл» и «ядерный цикл» используются как синонимы. В настоящее время принято разделять весь клеточный цикл на митоз – фазу, когда хромосомы находятся в компактном конденсированном и неактивном состоянии, и интерфазу – фазу между делениями, когда хромосомы деконденсированы и транскрипционно активны. Митоз подразделяется на профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу. В свою очередь интерфаза подразделяется на синтетическую фазу S (Synthesis), в ходе которой происходит удвоение генетического материала – репликация ДНК; предшествующую ей фазу G₁ (Gap) и следующую за S-фазой и предшествующую митозу фазу G₂. Впервые такое деление клеточного цикла на фазы было предложено Говард и Пелком [1]. Некоторые авторы дополнительно подразделяют фазу G₁ на две стадии: G₁-pm (G₁ постмитотическая или ранняя) и G₁-ps (G₁ пресинтети-

ческая или поздняя) по признаку чувствительности клеток к содержанию в среде культивирования ростовых факторов [2].

Не все клетки в организме или при культивировании *in vitro* постоянно находятся в клеточном цикле. В организме большинство терминально дифференцированных клеток необратимо утрачивает способность к делению. Другие клетки прекращают делиться, но под влиянием определенного пролиферативного стимула могут вернуться в клеточный цикл. Такие клетки обычно диплоидны, т.е. выход их из цикла произошел до начала S-фазы. Впервые к выводу о существовании обратимого выхода клеток из цикла пришли Лайта [3] и Квастлер [4], которые предложили для определения такого состояния клеток использовать термин «фаза G₀». Для культивируемых *in vitro* клеток, за исключением сильно малигнизированных, характерно существование определенной доли клеток в G₀-фазе и ее необходимо учитывать при анализе клеточной популяции.

Для определения доли клеток, находящихся в клеточном цикле, т.е. совокупности всех клеток за исключением клеток в G_0 , принято использовать термины «фракция роста» [5] или «пролиферативный пул» [6].

Изучение дифференциальной экспрессии различных белков в ходе клеточного цикла требует получения синхронно делящихся клеток. В естественных условиях синхронно идут несколько первых делений дробления в раннем эмбриональном развитии, при изучении которых и были открыты ключевые регуляторы клеточного цикла, названные циклинами, поскольку уровень этих белков в клетке изменяется циклически [7–10].

Наряду с циклинами сейчас известно несколько семейств белков, количество которых в клетке циклически меняется. Даже сам термин «циклин» был впервые использован для обозначения белка, по современной номенклатуре к циклинам не относящегося. Теперь этот белок называется PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) [11, 12].

В отличие от белков, связанных с регуляцией клеточного деления или репликации ДНК, активность синтеза множества других клеточных белков не зависит от стадии клеточного цикла — таковы постоянно необходимые клетке структурные белки цитоскелета — актин [13] или тубулины [14].

Клеточный цикл первых синхронных делений эмбриональных клеток «неполный» — в нем практически отсутствуют фазы G_1 и G_2 . Вместе с тем исследования последних лет показали, что некоторые принципиальные события «полного» клеточного цикла соматических клеток — критические точки (checkpoints) происходят именно в G_1 - и G_2 -фазах. В частности, точка рестрикции (R point или G_1 restriction point) — момент, когда клетка «решает» идти ли ей в следующий цикл, находится во второй половине стадии G_1 [9, 10].

Формирование митотического аппарата, в частности начало репликации центриолей [15–17], и начало расхождения центросом, будущих полюсов веретена деления в митозе [18], также могут начинаться в конце фазы G_1 и середине фазы G_2 соответственно.

Таким образом, для понимания процессов регуляции клеточного цикла исследование клеток в G_1 - и G_2 -фазах имеет первостепенное значение. В случае четкой внутриклеточной локализации предварительно определить изменение количества белка в клетке можно на основании морфологических исследований. Однако для более точного заключения о зависимости уровня количества белка от стадии клеточного цикла необходимо биохимическое изучение.

Для количественного анализа экспрессии белков необходимо иметь эти клетки в большом количестве и в виде достаточно чистых популяций, однако в отличие от клеточных делений раннего эмбрионального развития культивируемые клетки перевиваемых линий делятся асинхронно. Даже сестринские клетки, появившиеся в результате деления одной материнской, могут значительно различаться по продолжительности клеточного цикла [19, 20].

Для получения клеточной популяции, находящейся преимущественно в одной из стадий клеточного цикла, были разработаны различные методы синхронизации клеток. В предлагаемом обзоре рассмотрены основные методические приемы получения синхронизованных клеток культивируемых линий. Для эффективного использования синхронизации необходимо знание продолжительности всех стадий цикла изучаемой клеточной культуры. Основные методы определения длительности фаз клеточного цикла будут рассмотрены в первой главе.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

1.1. Определение общей продолжительности клеточного цикла. Общую продолжительность клеточного цикла в исследуемой клеточной линии можно определить на основании данных о времени удвоения количества клеток и доле клеток в G_0 -фазе.

Скорость роста клеточной популяции анализируется по динамике изменения количества клеток на определенной площади (например, среднее количество клеток на одно поле зрения микроскопа) вплоть до момента, когда клеточные островки не начнут смыкаться в монослой, что приводит к существенному контактному торможению пролиферации.

Параллельно необходимо фиксировать одновременно посаженные на стекла клетки, инкубированные в среде с бромдезоксипуридином (BrdU) в течение времени, достаточном для определения доли клеток в G_0 -фазе. Среднее время удвоения количества клеток рассчитывается по формуле: $t_d = t / \log_2 (N_t / N_0)$, где t_d — время удвоения количества клеток, t — время между начальным и конечным подсчетами количества клеток, N_0 и N_t — количество клеток в начале и конце эксперимента соответственно [21].

Для клеточных культур с низкой долей клеток в G_0 -фазе (0–5%) время удвоения незначительно отличается от продолжительности клеточного цикла (если доля клеток в G_0 равна ну-

лю, то время абсолютно совпадает). Если же доля клеток в G_0 выше, то для подсчета продолжительности клеточного цикла необходимо использовать формулу пересчета: $T = t_d / \log_2 [(2 - y) / (1 - y)]$, где T – продолжительность клеточного цикла, t_d – среднее время удвоения количества клеток и y – доля клеток в G_0 -фазе [21]. Такой анализ позволяет достаточно точно определить среднее значение продолжительности клеточного цикла (см. Приложение 1.1). Ее вариабельность для индивидуальных клеток можно определить с помощью прижизненных наблюдений, например, используя периодическую видеозапись [2].

1.2 Определение продолжительности S-фазы и всего цикла в одном эксперименте. Короткая инкубация асинхронной клеточной культуры (15–30 мин) в среде, содержащей BrdU, позволяет определить относительную продолжительность S-фазы в клеточном цикле. При этом необходимо учитывать долю клеток в G_0 -фазе и подсчитывать долю клеток в S-фазе, исходя из клеток только пролиферативного пула, величина которого эквивалентна доле клеток, включивших BrdU за время инкубации, заведомо превышающее длительность всего клеточного цикла. Для большинства клеточных культур продолжительность S-фазы составляет ~40% клеточного цикла [20, 22, 23].

Длительность S-фазы и всего клеточного цикла может быть определена более точно, если продолжить описанный выше эксперимент и периодически фиксировать клетки, растущие в среде, содержащей BrdU. Клетки в культуре делятся асинхронно, поэтому в каждый промежуток времени в S-фазу вступает одинаковое количество новых клеток (отклонения от этой закономерности обсуждаются ниже). Таким образом, выявляя включенный в ДНК BrdU, можно наблюдать прямо пропорциональный рост количества меченых клеток от времени инкубации.

Следует отметить, что в течение первых нескольких часов инкубации клеток в среде с BrdU скорость накопления меченых клеток несколько ниже, чем позднее. Продолжительность этого периода по времени эквивалентна суммарной продолжительности G_2 -фазы и митоза. Дело в том, что пока меченые клетки не прошли митоз, их количество действительно прямо пропорционально времени инкубации с BrdU. Однако, когда клетки, помеченные в конце S-фазы, проходят G_2 -фазу и митоз, они, разделившись, дают две меченые клетки из одной. Таким образом, по изменению динамики накопления меченых клеток можно определить суммарную длительность G_2 -фазы и митоза. Однако чаще это делают, определяя не общую долю меченых клеток, а долю меченых митозов (см. 1.3), так как трудно

точно определить небольшое изменение скорости накопления меченых клеток за столь короткий период времени. После того как последние клетки, находившиеся в G_2 -фазе в момент начала инкубации в BrdU, пройдут митоз, установится новая скорость накопления меченых клеток, отражающая суммарную динамику процессов вступления новых клеток из G_1 -фазы в фазу S и удвоения количества меченых клеток после митоза.

Далее, в определенный момент времени скорость роста доли меченых клеток начнет замедляться. Это связано с тем, что в S-фазу начнут вступать клетки, уже помеченные в конце S-фазы предыдущего клеточного цикла. Изменение угла наклона кривой на графике будет плавным из-за различий между клетками в длительности S-фазы и всего клеточного цикла. Точка пересечения прямолинейных продолжений среднего и конечного участков графика кривой накопления меченых клеток соответствует продолжительности клеточного цикла за вычетом продолжительности S-фазы – период «Т минус S». В связи с тем, что часть клеток в культуре находится в G_0 -фазе, доля меченых клеток не достигает 100%. С другой стороны, нельзя ожидать полного прекращения роста доли меченых клеток, так как каждая пролиферирующая клетка в условиях нелимитированного роста, как было отмечено ранее, в результате митоза образует две меченые клетки из одной, что снижает общую долю немеченых (неделящихся) клеток вдвое каждый цикл. В свою очередь этот процесс частично компенсируется выходом части клеток из цикла, что может приводить в течение определенного времени к стабилизации величины пролиферативного пула [21].

Таким образом, зная долю S-фазы от всего клеточного цикла из первой части эксперимента и продолжительность периода «Т минус S» из второй части эксперимента, решая систему уравнений, можно вычислить длительность клеточного цикла (Т) и S-фазы (см. Приложение 1.2).

1.3. Определение продолжительности G_2 -фазы клеточного цикла. Для определения продолжительности G_2 -фазы клеточного цикла существует единственный надежный метод, названный методом меченых митозов [24]. В настоящее время вместо мечения реплицирующейся ДНК [^3H]тимидином и последующего выявления меченых клеток автордиографическими методами используется мечение клеток в S-фазе включением BrdU с последующим выявлением его специфическими антителами. Для того чтобы митоз оказался меченым, необходимо, чтобы клетка находилась в S-фазе в момент начала инкубации. Время инкубации, когда появляется

первый меченый митоз (точнее первая меченая ранняя профаз митоза), соответствует минимальной продолжительности G_2 -фазы. Поскольку для фиксированных клеток невозможно точно определить, насколько долго клетка находилась в каждой стадии митоза, обычно принимают, что она находится в середине данной стадии. Для более точного определения минимальной продолжительности G_2 -фазы необходимо также учитывать стадию первых меченых митозов. Например, если через 2 ч инкубации с BrdU была обнаружена меченая клетка в метафазе, то минимальная продолжительность G_2 -фазы будет равна 2 ч минус продолжительность профазы, прометафазы и половины метафазы. Кроме того, для того чтобы клетка включила BrdU, она какое-то минимальное время должна была находиться в S-фазе. Следовательно, реальная минимальная продолжительность G_2 -фазы еще несколько ниже рассчитанной (обычно этим временем пренебрегают, однако, исходя из вероятности, можно принять это время за половину времени инкубации клеток в BrdU).

По полученным данным строится график зависимости доли меченых митозов от времени инкубации клеток в среде с BrdU. Средним значением длительности G_2 -фазы считается то время, когда 50% митозов оказываются мечеными, минус половина длительности митоза. Более точно можно подсчитать среднюю продолжительность G_2 , если считать только процент меченых профаз. В этом случае средняя продолжительность G_2 будет равна времени регистрации 50% меченых профаз за вычетом половины длительности профазы.

Максимальная продолжительность G_2 -фазы соответствует времени инкубации, когда обнаруживается последний немеченый митоз за вычетом времени с начала митоза до середины стадии этого митоза. Другим способом можно рассчитать максимальную продолжительность G_2 -фазы, определив минимальное время, когда все митозы оказываются мечеными за вычетом продолжительности митоза (см. Приложение 1.3).

1.4. Определение продолжительности митоза. Длительность митоза можно оценить, исходя из продолжительности всего клеточного цикла, доли клеток в G_0 -фазе и митотического индекса. Обычно в культивируемых клетках позвоночных митоз длится ~1 ч и составляет 3–5% общей продолжительности клеточного цикла.

Продолжительность различных стадий митоза определяется при прямом прижизненном наблюдении клеток. Следует отметить, что нормальное прохождение митоза существенно зависит от температуры, поэтому прижизненные наблюдения необходимо проводить при той же

температуре, при которой клетки культивируются (см. Приложение 1.4).

1.5. Определение продолжительности G_1 -фазы клеточного цикла. Продолжительность G_1 -фазы может быть рассчитана как из данных о длительности остальных стадий клеточного цикла (см. Приложение, п. 5), так и определена экспериментально. Наиболее точный, но и наиболее трудоемкий метод состоит в том, что клетки прижизненно наблюдают различное время после митоза и затем фиксируют, предварительно импульсно (15–30 мин) проинкубировав в среде, содержащей BrdU. Этим способом можно определить как среднее значение длительности G_1 -фазы, так и его вариабельность.

Продолжительность G_1 может быть также определена по времени начала включения BrdU клетками, предварительно синхронизованными в митозе.

1.6. Определение продолжительности всех стадий клеточного цикла в одном эксперименте. Суммируя результаты, изложенные в настоящем разделе, можно предложить схему эксперимента, в котором одновременно определяются все параметры клеточного цикла. Для этого асинхронную клеточную культуру инкубируют в среде, содержащей BrdU, фиксируя клетки в определенные моменты времени и окрашивая их антителами к BrdU.

Чтобы определить долю клеток в G_0 -фазе, клетки инкубируют в среде с BrdU в течение времени, заведомо большего, чем продолжительность клеточного цикла. Доля клеток, не включивших BrdU, и покажет долю клеток в G_0 -фазе. Длительность S-фазы и всего клеточного цикла определяют из данных о доле клеток в G_0 -фазе, доле меченых клеток в начале опыта и времени точки перегиба (точка «Т минус S») кривой графика накопления меченых клеток. Митотический индекс (доля клеток в митозе) показывает соотношение продолжительности митоза и продолжительности всего клеточного цикла. При этом надо принимать в расчет только клетки пролиферативного пула. Продолжительность G_2 -фазы соответствует времени, когда после инкубации клеток в среде с BrdU половина митозов оказывается меченой (подробнее в разделе 1.3). Продолжительность фазы G_1 определяют вычитанием длительности всех остальных фаз из общей продолжительности клеточного цикла.

2. ОБЗОР МЕТОДОВ СИНХРОНИЗАЦИИ

Многочисленные методы были использованы для получения фракций клеток, преимущественно находящихся на одной из стадий клеточ-

ного цикла [25–33], но для каждой клеточной линии оптимальные условия синхронизации необходимо подбирать индивидуально. Как уже было отмечено, время действия синхронизирующими агентами определяется, исходя из продолжительности фаз цикла исследуемого типа клеток. Другим принципиальным параметром является концентрация веществ, используемых для синхронизации. Одна и та же концентрация может обратимо останавливать клеточный цикл в одном типе клеток и не блокировать продвижение клеток по циклу или приводить к индукции апоптоза в других клеточных культурах.

Получить клетки различных фаз, используя какое-либо одно воздействие, невозможно, поскольку вследствие вариабельности продолжительности всех стадий клеточного цикла, происходит прогрессивная рассинхронизация по мере культивирования. Таким образом, представляется необходимым использовать комбинированное последовательное воздействие на клетки несколькими синхронизирующими агентами.

В следующем разделе приведены примеры веществ, наиболее часто используемых для синхронизации клеток, а также физические методы, применяющиеся для разделения клеток различных фаз. Поскольку многие принципы синхронизации клеток были первоначально сформулированы при использовании в качестве синхронизирующего воздействия метода «тимидинового блока», описание этого метода приведено первым.

2.1. Химические вещества, используемые для синхронизации клеток. *Тимидин* (thymidine) при избытке в среде культивирования (2–2,5 мМ) увеличивает внутриклеточный пул dТТР в ~5 раз и это приводит к ингибированию перехода СDP в dCDP, что вызывает ингибирование репликации ДНК и задержку клеток в S-фазе [34, 35]. Клетки, находящиеся в момент начала инкубации в среде с высоким содержанием тимидина в митозе, в G₂ или в G₁ аккумулируются в ранней S-фазе, а клетки бывшие на этот момент в S-фазе задерживаются в ней. Таким образом, инкубация, соответствующая по времени продолжительности периода «Т минус S», приводит к тому, что в клеточной популяции присутствуют две группы клеток: синхронизованные клетки в ранней S-фазе и несинхронизованные клетки в ранней, средней или поздней S-фазах. Для того чтобы получить более синхронную клеточную популяцию, используется «двойной тимидиновый блок» [36, 37]. После первой инкубации в среде с тимидином клетки отмывают свежей средой и культивируют в ней в течение времени, достаточном для того, чтобы все клетки, накопленные в ранней S-фазе в процессе первого тимидино-

го блока, достигли фазы G₂ (т.е. время, эквивалентное максимальной продолжительности S-фазы). Поскольку практически для всех клеточных линий суммарная продолжительность G₂, митоза и G₁ (даже минимальная) превосходит максимальную продолжительность S-фазы, клетки, остановленные в поздней S-фазе первым тимидиновым блоком, не успевают за время отмывания дойти до следующей S-фазы. Далее клетки вторично инкубируют в среде, содержащей 2–2,5 мМ тимидин, в течение времени «G₂ + митоз + G₁». Таким образом, в идеальном варианте все клетки пролиферативного пула будут аккумулированы на границе G₁-S- или в ранней S-фазе. Для более полного и быстрого снятия тимидинового блока рекомендуется после отмывания культивировать клетки в среде, содержащей 10–24 мкМ дезоксицитидин (deoxycytidine) [26, 38].

К недостаткам синхронизации клеток «тимидиновым блоком» в первую очередь можно отнести влияние его не только на репликацию ДНК, но и на биосинтез РНК [39]. В связи с этим не рекомендуется инкубировать клетки в среде с высоким содержанием тимидина более 16 ч [38], что позволяет использовать этот метод синхронизации только для клеток с относительно коротким клеточным циклом.

Афидиколин (aphidicolin) – ингибитор ДНК полимеразы α [27, 40–42], применяется для синхронизации клеток в S-фазе в концентрациях 1–10 мкг/мл, обладает относительно низкой токсичностью для клеток и хорошо отмывается [43–45]. Оптимальная концентрация афидиколина может различаться для разных клеточных культур. Например, для клеток человеческой меланомы для ингибирования синтеза ДНК до уровня ниже 20% необходимо использовать концентрацию афидиколина 10 мкг/мл [46]. В то время как для других клеточных линий концентрация 1–3 мкг/мл достаточна для полного подавления синтеза ДНК [42, 44, 45, 47–49]. Поскольку клетки, находившиеся на момент начала инкубации в S-фазе, задерживаются в продвижении по циклу, для эффективной синхронизации необходимы или двойная обработка афидиколином [42] с промежуточной отмывкой клеток в течение времени, эквивалентного максимальной продолжительности S-фазы, или предварительная синхронизация клеток другим методом, например сывороточным истощением [44, 45] или изолейциновым голоданием [50].

Гидроксимочевина (hydroxyurea) является ингибитором рибонуклеотид-дифосфатредуктазы [51], при добавлении в среду культивирования в концентрации 0,5–1 мМ [33, 52] вызывает задержку клеток в ранней S-фазе за счет истощения пула дезоксирибонуклеотидов.

Изолейциновое голодание (isoleucine deprivation). Этот метод, разработанный для клеток китайского хомячка линии CHO (Chinese hamster ovary) [26], впоследствии был с различной эффективностью опробован и для других клеточных культур [53]. Поскольку после переноса в полную среду культивирования клетки вступали в S-фазу через ~4 ч, можно заключить, что отсутствие в среде изолейцина блокирует продвижение по клеточному циклу в середине G₁-фазы.

Ингибитор кальпаина (calpain inhibitor I — ALLN (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal) — ингибитор цистеиновых и сериновых протеиназ, включая кальпаин [32, 54], вызывает ингибирование деградации циклинов. В концентрации 40 мкг/мл он задерживает клетки XL2 в метафазе на несколько часов [45]. При этом веретено деления имеет нормальное строение.

Ловастатин (lovastatin) и его аналог *мевастатин* или *компактин* (mevastatin, compactin) являются ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA (HMG-CoA)-редуктазы. Обработка ловастатином задерживает клетки в G₁-фазе до точки рестрикции [54–57]. Для синхронизации клеток ловастатин применяется в концентрации 5 мкМ, однако уже в концентрации 10 мкМ он может вызывать заметную индукцию апоптоза [56].

Метотрексат (methotrexate, MTX) — аналог тимидина, блокирует тетрагидрофолатредуктазу, которая предотвращает метилирование dUMP тимидилатсинтетазой [58]. В концентрациях 0,88–5 мкМ [43, 52, 59, 60] метотрексат приводит к остановке клеточного цикла и накоплению клеток в G₀/G₁. Необходимо отметить, что при синхронизации клеток метотрексатом используемая для их культивации среда не должна содержать тимидина.

Мимозин (mimosine) — это редкая растительная аминокислота, которая является хелатирующим агентом и предотвращает образование новых репликативных вилок, ингибируя рибонуклеазу-редуктазу и вызывая уменьшение пула dATP и dGTP [61–63]. Мимозин нарушает дезоксирибонуклеотидный метаболизм и воздействует, таким образом, на фазу элонгации ДНК. Он используется в концентрациях 200–600 мкМ [30, 33, 64] для синхронизации клеток в ранней S-фазе.

Нокодазол (nocodazole) (а также два других вещества — *колхицин* (colchicine) и *колцемид* (colcemide)), вместе называемые антимицротрубочковыми ядами) существенно повышает критическую концентрацию полимеризации тубулина в клетке, что приводит к деполимеризации микротрубочек и блоку митоза [28, 43, 52, 54, 65, 66]. Несмотря на то, что микротрубочки играют важную роль в интерфазных клетках, их деполи-

меризация не приводит к остановке по крайней мере большинства клеток в продвижении по клеточному циклу от G₁ к митозу. Описана только временная задержка клеток в G₂-фазе клеточного цикла [67]. Даже очень низкие концентрации нокодазола способны останавливать клетки в митозе, поэтому для каждой клеточной линии подбирается минимально достаточная концентрация (обычно 0,1–0,5 мкг/мл). При длительной инкубации для многих типов клеток обработка нокодазолом может приводить к переходу клеток в интерфазу без анафазного расхождения хромосом, т.е. к полиплоидизации [68].

Стауроспорин (staurosporine) — это алкалоид, который ингибирует циклинзависимую киназу (cdk), связываясь с белком ретинобластомы [69, 70]. Для синхронизации клеток в G₁-фазе стауроспорин применяется в концентрации 100 нМ, но при длительном воздействии это может приводить к апоптозу [71–73].

Сывороточное истощение (serum depletion). Для нормального продвижения по клеточному циклу немалигнизированные клетки нуждаются во внешних ростовых факторах. Эти факторы обычно содержатся в эмбриональной сыворотке, которая добавляется в среду культивирования. Отсутствие в среде сыворотки приводит к задержке клеток в G₁-фазе или выходу из цикла в G₀-фазу [2, 74–76].

Трихостатин А (trichostatin A, TSA) — ингибитор деацетилаз гистонов [77]. В концентрациях 0,1–5 мкМ обратимо блокирует клетки и в G₁-, и в G₂-фазах [52, 77, 78].

5-Флуорордеоксиуридин (5-fluorodeoxyuridine) ингибирует тимидилатсинтазу, блокируя, таким образом, клетки в ранней S-фазе клеточного цикла [79]. Для синхронизации используется в концентрации 0,05 мкМ [80].

Хехст 768159 (Hoechst 768159 — [2-(4-hydroxytoluene-3-yl)-4,5-dihydro-4-carboxythiazole]) ингибирует посттрансляционные изменения редкой аминокислоты гипузина (hypusine), в концентрации 40 мкМ останавливает клетки в поздней G₁-фазе клеточного цикла [81].

Циклопироксоламин (cicloroxolamine, CPX) является ингибитором инициации репликации ДНК [54, 82] и блокирует клетки на границе G₁/S, для синхронизации клеток используется в концентрации 10 мкМ [64].

Этопозид (etoposide, VP16) — ингибитор ДНК топоизомеразы 2, широко распространенный антираковый препарат, вызывает задержку клеток в S-фазе клеточного цикла и блок на границе G₂/M. Для синхронизации культивируемых *in vitro* клеток он применялся в концентрациях от 0,7 до 10 мкМ [83, 84]. Этопозид вызывает специфическую инактивацию киназной активнос-

ти, связанной с циклином А (CDK2), что приводит к активации S-фазного и G₂/M-check-point-контроля. При длительной инкубации обработка клеток этопозидом вызывает апоптоз.

2.2. Физические методы синхронизации и селективного разделения клеток. Охлаждение клеток замедляет все клеточные процессы и приводит к увеличению доли клеток в G₁-фазе и их выходу из цикла в G₀-фазу. Однако при возвращении клеток в нормальные условия культивирования они идут по циклу несинхронно. Таким образом, охлаждение клеток можно использовать для получения популяции клеток в G₀. Охлаждение также используется для предотвращения выхода в G₁-фазу при накоплении митотических клеток, синхронизованных другими методами [43].

Разделение центрифугированием (centrifugal elutriation) применяется для суспензионных клеточных культур или клеток, снятых с подложки. Принцип метода состоит в том, что клетки разделяются по размеру за счет различной плавучей плотности при центрифугировании [85–87]. Для этого используется специальный ротор центрифуги, оборудованный трубками для протока жидкости. Этот метод позволяет получать лишь клеточные фракции, обогащенные клетками в G₁, S или G₂, но не чистые фракции клеток различных фаз клеточного цикла. В комбинации с предварительной химической синхронизацией метод позволяет получать достаточно чистые популяции синхронизованных клеток [83].

Стряхивание (shake-off) митотических клеток достаточно эффективно для клеточных линий, у которых метафазные клетки приобрели шаровидную форму и слабо прикреплены к субстрату (например, для мышечных фибробластов [88]). Этот метод применяется после предварительной инкубации клеток в среде с антимитотическими ядами для повышения процента митозов за счет блока формирования митотического веретена (см. нокодазол). Для эпителиальных клеток метод существенно менее эффективен. Для повышения выхода митотических клеток культивирование ведется в специальных медленно (0,5 об/мин) вращающихся емкостях, которые периодически (каждые 10 мин) вращаются со скоростью 200 об/мин для стряхивания слабоприкрепленных митотических клеток. Для предотвращения выхода в G₁-фазу накопленных митотических клеток используется их охлаждение [43]. Для лучшего прикрепления интерфазных клеток емкости для культивирования предварительно обрабатываются ацетатом магния [89].

Разделение клеток в проточном цитофлуориметре. Принцип метода заключается в автома-

тизированном разделении клеток, предварительно прижизненно окрашенных флуоресцентными красителями, стехиометрически связывающимися с ДНК, например Hoechst 33342 [90]. Недостатки этого метода аналогичны недостаткам метода разделения клеток центрифугированием: метод не позволяет отделять клетки в G₂-фазе от митотических и тетраплоидных клеток в G₁-фазе.

В Приложении ко второй главе приведен пример разработки оптимального протокола для синхронизации клеток линии XL2.

3. РАСЧЕТ ПРОЦЕНТНОГО СОДЕРЖАНИЯ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ФАЗ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА ВО ФРАКЦИЯХ СИНХРОНИЗОВАННЫХ КЛЕТОК

Для анализа уровня экспрессии различных белков в клеточном цикле необходимо прежде всего проанализировать состав клеточных фракций, полученных в результате синхронизации. Для этого существуют два основных методических подхода.

1. Состав клеточных фракций может быть исследован с помощью автоматизированного анализа флуоресцентно меченных ядер клеток в проточном цитофлуориметре – FCM (Flow Cytometry)-анализ [44, 91–93]. В своем первоначальном варианте такой анализ основывался на том, что флуоресцентный краситель (обычно пропидиум-иодид или DAPI (Diamidino-Phenyl-Indole)), стехиометрически связанный с ДНК, может быть количественно детектирован для каждой клетки (универсальный анализ на количество ДНК). Позднее были разработаны мультивариантные методы, позволяющие проводить анализ клеток сразу по нескольким параметрам, в частности по их размеру и количеству включившегося в ДНК BrdU [94].

FCM-Анализ позволяет получить общее представление о динамике изменений соотношения клеток в G₁-, S- и G₂/M-фазах клеточного цикла. Однако в отличие от клеток в организме в клеточных культурах количество хромосом и соответственно ДНК может варьировать в довольно широких пределах – часть клеток анеуплоидна, часть тетраплоидна. Кроме того, FCM-анализ не позволяет разделить клетки в G₂ и митозе (и обе эти группы от тетраплоидных клеток в G₁) и клетки в G₁ и G₀, что также значительно снижает применимость метода для точного анализа соотношения клеток различных фаз в составе фракций. Анализ экспериментальных данных, полученных разными авторами, позволяет заключить, что использование результатов

FCM-анализа без цитологического контроля морфологии синхронизированных клеток приводит к неправильной интерпретации полученных результатов [68, 95].

Для клеток, прикрепленных к подложке, был разработан комбинированный метод, сочетающий высокую скорость FCM-анализа и точность иммуноцитохимического (см. далее) анализа, – LSCM-анализ (Laser Scanning Cytometry). Для автоматизированного анализа клеток используется связанный с микроскопом микроцитофлуориметр, с помощью которого можно анализировать до 100 клеток в 1 с с высокой чувствительностью [96]. Этот метод имеет существенные преимущества перед FCM-анализом, поскольку в процессе подготовки образцов нет необходимости использовать центрифугирование клеток, неизбежно приводящее к их повреждению и частичной потере. Кроме того, как и при цитологическом исследовании, есть возможность использовать визуальный контроль клеточной морфологии [97].

2. Наиболее надежным и точным методом исследования состава клеточной популяции является цитологическое исследование клеток, предварительно меченных веществами, прижизненно включающимися в ДНК в ходе S-фазы клеточного цикла. Собственно, так и было сделано Ховард и Пелком [1] открытие синтетической фазы клеточного цикла. Авторы этой работы, предопределив все дальнейшее развитие исследований клеточного цикла, обнаружили, что радиоактивный фосфор (^{32}P) включается в состав хромосом в интерфазе, причем не постоянно, а лишь на протяжении определенного периода времени. Так, было установлено, что удвоение генетического материала хромосом происходит не в профазе, как считалось ранее на основании наблюдения расхождения хроматид, а в ходе интерфазы. Однако даже сейчас, спустя полвека после этого открытия, в некоторых обзорах (особенно эмбриологических) приходится читать, что клетки перед митозом (или первым делением мейоза) диплоидны, а не тетраплоидны, как это на самом деле. Позднее, для исследования включения предшественников в состав ДНК радиоактивный фосфор был заменен более специфическими маркерами, среди них наиболее используемым стал [^3H]-тимидин. Метод радиоавтографии (или автордиографии) позволил установить все принципиальные закономерности клеточного цикла [9, 98]. В последние годы в связи с развитием иммуноцитохимических методов [^3H]-тимидин в качестве маркера все чаще заменяют нерадиоактивными маркерами, наиболее распространенным среди которых является бромдезоксисуридин (BrdU).

После фиксации клеток включившийся в ДНК BrdU выявляется специфическими моноклональными антителами [99]. Таким образом, после импульсного мечения (15–30 мин, 20–40 мкМ BrdU) определяется доля клеток в S-фазе клеточного цикла. Доля клеток, находящихся в G_0 -фазе, определяется по индексу немеченых клеток после инкубации их в среде с BrdU в течение времени, заведомо превышающего продолжительность клеточного цикла. Доля клеток в митозе определяется прямым наблюдением фиксированных клеток в фазовоконтрастный микроскоп или после окраски ДНК в клетках DAPI или другим красителем, окрашивающим хромосомы.

Доля клеток в G_1 - и G_2 -фазах клеточного цикла в несинхронных популяциях может быть определена с помощью уравнений Квастлера [24], устанавливающих, что отношение доли клеток в какой-либо фазе клеточного цикла к продолжительности этой фазы есть величина постоянная. Однако в результате синхронизирующих обработок такие пропорциональные соотношения изменяются и уравнения Квастлера становятся неприменимыми. В этом случае необходимо исследовать динамику изменения доли клеток в митозе и S-фазе, начиная с такой точки отсчета, когда в клеточной популяции отсутствуют клетки или в G_1 -, или в G_2 -фазе. Например, при синхронизации клеток афидиколином, гидроксимочевинной, тимидином клетки накапливаются в S-фазе или на границе G_1/S . Одновременно все клетки, бывшие в момент начала воздействия в G_2 и митозе, проходят эти стадии. Таким образом, на момент отмывания синхронизирующего вещества в клеточной популяции полностью отсутствуют клетки в G_2 -фазе и митозе, а доля клеток в G_1 может быть рассчитана из доли клеток в S-фазе и G_0 . Далее изменение доли клеток в различных фазах цикла рассчитывается на основании данных о динамике изменения доли клеток в S-фазе и митозе.

Поскольку большинство клеток в момент начала отмывания афидиколина находилось на границе G_1/S , то через время, примерно эквивалентное продолжительности S-фазы, эти клетки перейдут в фазу G_2 . Следует отметить, что в этих условиях S-фаза в среднем несколько короче, чем в нормальной асинхронной клеточной культуре [44, 45]. Вероятно, в процессе синхронизации клетки накапливают определенные факторы, позволяющие им быстрее заканчивать репликацию ДНК.

Поскольку повышение доли клеток в G_2 происходит за счет перехода клеток из S-фазы, а снижение доли клеток в G_2 -фазе происходит за счет выхода их в митоз, формула расчета доли клеток в G_2 -фазе будет иметь следующий вид:

$G_2(n) = G_2(n-1) + [S(n-1) - S(n)] - M(n)$. Так как продолжительность митоза составляет ~ 1 ч, для изучения динамики изменения доли клеток в G_2 -фазе необходимо фиксировать клетки каждый час после начала отмывания афидиколина. В приведенной формуле точка $(n-1)$ соответствует точке фиксации за 1 ч до рассчитываемой. Поскольку доля клеток в G_1 увеличивается за счет клеток, прошедших митоз в предыдущий час, то формула для расчета доли G_1 будет следующей: $G_1(n) = G_1(0) + 2M(n-1)$.

Для популяции клеток, синхронизованных в митозе комбинированным воздействием нокодазола и ALLN (после синхронизации афидиколином), состав клеточной популяции рассчитывается следующим образом: поскольку в митозе блокированы все клетки, синхронизованные ранее афидиколином на границе G_1/S , то выявляемые в этих условиях клетки в S -фазе представляют собой несинхронную часть популяции. Поэтому для расчета доли клеток в G_2 -фазе можно использовать уравнения Квастлера [24]. Другими словами, доля клеток в G_2 -фазе будет пропорционально меньше доли клеток в S -фазе в соответствии с длительностью этих фаз. Доля клеток в G_1 -фазе в митотической фракции далее может быть рассчитана вычитанием доли клеток уже известных фаз.

Следующая методика может быть использована для расчета состава клеточной популяции во фракции с максимальным содержанием клеток в G_1 -фазе, которая получена 10-часовой инкубацией в полной среде после отмывания смеси нокодазол-ALLN. За это время все синхронизованные клетки переходят из митоза в G_1 -фазу. С другой стороны, этого времени недостаточно для того, чтобы эти клетки дошли до S -фазы. Клетки, оставшиеся к этому времени в митозе и G_2 -фазе, представляют собой несинхронизованную часть клеточной популяции. Поэтому без большой погрешности можно рассчитать долю клеток в G_2 -фазе по доле клеток в митозе — их доля будет пропорционально больше, чем митотических, в соответствии с длительностью G_2 -фазы по сравнению с митозом.

В приложении к главе 3 приведен состав фракций синхронизованных клеток XL2, рассчитанный на основании приведенных в этой главе правил.

4. ИЗУЧЕНИЕ СРАВНИТЕЛЬНОГО УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКОВ В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ

Для количественного анализа изменений уровня экспрессии белка в клеточном цикле необходимо использовать для всех образцов в им-

муноблоттинге одинаковое количество клеток. Для подсчета клеток суспензионных культур применяется камера Горяева или аналогичные ей камеры. Для клеток, растущих на подложке, необходимо определить среднюю плотность клеток (например, подсчитывая количество клеток в 10–20 полях зрения микроскопа с измеренным объект-микрометром диаметром) и, исходя из площади культурального флакона, рассчитать общее количество клеток.

Однако даже при самом тщательном подсчете количества клеток могут появляться ошибки, возникающие в процессе выделения белков. Поэтому лучше сравнивать не абсолютные количества белков во фракциях из клеток различных фаз, а их количество относительно белка, концентрация которого меняется в ходе клеточного цикла известным образом, например с β -тубулином. Концентрация тубулина растет пропорционально клеточной массе и не отличается в интерфазных и делящихся клетках [12, 100]. Соответственно, измеряя относительное количество белка к уровню β -тубулина, можно определить отклонение от пропорционального роста количества исследуемого белка в клеточном цикле. Другими, часто используемыми в качестве стандартов белками являются актин и циклинзависимая киназа 2 (cdc2) [45].

При использовании данных, полученных при анализе клеток с высоким уровнем синхронизации, можно сделать достаточно обоснованные выводы об изменении экспрессии различных белков в ходе клеточного цикла. Однако при использовании фракций с меньшей степенью синхронизации такой анализ системы с четырьмя переменными весьма затруднителен. Определить, является ли выявляемый во фракции синхронизованных клеток белок характерным для этой фазы клеточного цикла или фиксируемый сигнал связан с «загрязнением» фракции клетками других фаз, невозможно. Кроме того, при каждой синхронизации соотношение клеток различных фаз клеточного цикла во фракциях варьирует и возникает необходимость стандартизировать результаты анализа, чтобы иметь возможность корректно сравнивать их между собой.

Для разрешения этих проблем в моей предыдущей работе [101] был описан метод математической обработки данных, позволяющий определить уровень экспрессии белков в гипотетических клеточных популяциях, состоящих исключительно из клеток одной из фаз клеточного цикла. На реальной клеточной культуре такие фракции получить невозможно, доля синхронизованных клеток в G_1 - и S -фазах в лучшем случае обычно составляет 80–95%, а в G_2 -фазе или

митозе — 60–75%. Суть предложенного метода состоит в том, что после получения четырех фракций частично синхронизированных клеток их используют для определения уровня экспрессии исследуемых белков. Составляя систему уравнений, исходя из данных об уровне белка и доле клеток каждой фазы цикла в соответствующих фракциях и решая ее, получаем расчетный уровень белка для фракций со 100%-ным содержанием клеток для каждой из фаз [101]. Несмотря на то, что в цитированной работе расчет был произведен на основании данных, полученных при анализе фракций, полученных из клеток с высокой степенью синхронизации, предлагаемый метод позволяет использовать для анализа динамики изменения количества белков даже лишь частично синхронизированные клеточные популяции, при условии точного определения в них содержания клеток различных фаз цикла. Благодаря этому можно снизить время синхронизации клеток и тем самым минимизировать токсический эффект синхронизирующего воздействия и несбалансированный рост клеток.

В Приложении к главе 4 приведен пример сравнения расчета уровня экспрессии нескольких белков по данным, полученным при исследовании реальных фракций синхронизированных клеток, с расчетными данными для гипотетических «чистых» фракций.

При планировании экспериментов по синхронизации клеток решающее значение имеет правильный подбор синхронизирующих воздействий. Метод синхронизации зависит от поставленной задачи, однако неперенным условием является то, что, если предполагается изучить какой-либо процесс в синхронизированных клетках, то вещество, останавливающее клетки в определенной стадии цикла, не должно прямо влиять на этот процесс.

Само по себе селективное торможение отдельных процессов клеточного цикла может приводить к так называемому «несбалансированному» клеточному росту [22, 54]. Это явление связано с тем, что в клетке согласование различных процессов происходит только в определенных точках клеточного цикла. И, если искусственно затормозить или остановить одни процессы, другие могут продолжаться. В частности, рост клетки после прохождения ею точки рестрикции в G_1 -фазе не зависит от того, идет ли параллельно репликация ДНК. Это может приводить к тому, что после длительной синхронизации, например тимидином, клетки почти достигают размеров, характерных для клеток в G_2 -фазе, имея количество ДНК, соответствующее клеткам в G_1 - или S-фазе [22]. При этом на-

копление некоторых белков в клетках в процессе синхронизации может несколько сокращать продолжительность последующей стадии клеточного цикла после удаления синхронизирующего вещества [44, 45]. Все это необходимо учитывать при интерпретации результатов, полученных на синхронизированных клетках.

С другой стороны, многие эксперименты с синхронизирующими веществами ставятся именно для разобшения различных внутриклеточных процессов с целью изучить их взаимозависимость и взаимообусловленность. В этих экспериментах информация, полученная при сравнении различных синхронизирующих обработок, используется для выяснения причинно-следственных связей между различными процессами клеточного цикла.

Многие из веществ, используемых для синхронизации клеток, применяются в медицине для химиотерапии при раковых заболеваниях. Это действие основано на селективном (часто, увы, недостаточно селективном) воздействии на быстрорастущие клетки опухолей. Для анализа новых антираковых препаратов необходимо предварительно подробно исследовать их эффект на клетках *in vitro*, в том числе раковых, и выяснить цитотоксичность используемых веществ в зависимости от стадии клеточного цикла. Поиск оптимальной комбинации таких препаратов (также и в сочетании с облучением и другими методами лечения) также предполагает предварительное исследование на клеточных культурах. Поэтому разработка методов синхронизации клеток кроме чисто научного значения имеет и важное прикладное медицинское значение для выработки наиболее эффективных и селективных методов лечения онкологических заболеваний.

В заключение хотелось бы отметить существенное преимущество использования для исследования регуляции клеточного цикла клеточных культур шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. В отличие от клеток млекопитающих использование клеточных культур *Xenopus* позволяет параллельно легко исследовать белки в процессе оогенеза и ранних стадиях эмбриогенеза, используя для этого стимулированные *in vitro* ооциты. Это делает возможным проводить сравнительный анализ митоза и мейоза, а также сравнивать «полный» клеточный цикл культивируемых клеток с редуцированным (без G_1 и G_2 фаз) клеточным циклом ранних делений дробления. Немаловажно также и то, что температура культивирования (25°), оптимальная для этих клеток, одновременно является комфортной и для экспериментатора, что существенно облегчает все манипуляции с клетками, в частности прижизнен-

ные наблюдения. Все это делает клеточную культуру XL2, хорошо изученную в плане клеточного цикла и условий синхронизации, наиболее удобным объектом таких исследований.

Автор выражает благодарность Ю.С. Ченцову, В.Ю. Полякову и И.И. Кирееву за внимательное прочтение обзора, высказанные замечания и ценные предложения. Автор также благодарит В.А. Каймановича (Математический институт Университета Ренн-1, Франция) за полезные консультации по математическим вопросам. Эта работа была бы невозможна без многолетнего плодотворного сотрудничества автора с сотрудниками лаборатории Биологии и генетики развития Университета г. Ренна (Universite

Rennes-1, CNRS UMR 6061, France) М. Филиппом, К. Прижоном, Я. Арле-Боннемэ, И. Шартреном и другими, которым я искренне признателен.

Хочу также поблагодарить С. Гольшева за помощь в работе с литературными источниками и Э. Тимирбулатову и И. Киреева за помощь в подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Национального центра научных исследований (CNRS, France), который финансировал работу автора в качестве приглашенного исследователя и Университета Ренн-1 (Universite Rennes-1, France), финансировавшего работу автора в качестве приглашенного профессора.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение к главе 1

1.1. Определение общей продолжительности цикла в клетках XL2. XL2-Клетки были посажены на стекла и через 48 ч культивирования их плотность составила 1463 клетки на 1 мм². Через 72 ч эксперимента (120 ч после посадки клеток) плотность клеток выросла до уровня 7161 клетка на 1 мм². Таким образом, количество клеток выросло в 4,89 раза и среднее время удвоения клеток составило 31,44 ч ($\log_2 4,89$). Доля клеток в G₀ в ходе эксперимента оказалась равной 0,179. Отсюда и средняя продолжительность клеточного цикла: $T = 31,44 / \log_2 [(2-0,179)/(1-0,179)] = 31,44/1,16 = 27,1$ ч (27 ч 06 мин).

1.2. Определение в одном эксперименте продолжительности S-фазы и всего цикла в клетках XL2. В клетках XL2 доля импульсно меченных BrdU клеток была 0,300, доля клеток в G₀ в этом эксперименте – 0,215. Таким образом, доля клеток в S от клеток в цикле: $0,3/(1-0,215) = 0,382$. Клетки, инкубированные в среде с BrdU, фиксировались через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 28 и 33 ч, в каждой точке доля мечения подсчитывалась на 5000 клеток. Точка перегиба кривой графика зависимости количества меченых клеток от времени была отмечена спустя 17,4 ч после начала эксперимента. Следовательно, $S/T = 0,382$ и «T-S» = 17,4 ч; отсюда $T = 17,4/(1-0,382) = 28,2$ ч (28 ч 12 мин), $S = 0,382 \cdot 28,2 = 10,77$ ч (10 ч 46 мин).

На основании результатов описанного выше эксперимента продолжительность S-фазы можно также рассчитать и по другой формуле [98]: $S = N_0 t / (N_t - N_0)$, где N_0 – доля меченых клеток

в начальный момент времени, N_t – доля меченых клеток через время t (на среднем прямолинейном участке графика). В этой формуле долю клеток в G₀ можно не учитывать (и соответствующую поправку можно не вносить), так как коэффициент доли делящихся клеток в формуле одинаков и для числителя и для знаменателя. Для клеток XL2 в эксперименте через 9 ч инкубации с BrdU доля меченых клеток была 0,563. Соответственно продолжительность фазы $S = 0,304 \cdot 9 / (0,563 - 0,304) = 10,56$ ч (10 ч 34 мин). Исходя из величины S , можно рассчитать и продолжительность всего клеточного цикла: $T = 10,56 / 0,382 = 27,64$ ч (27 ч 38 мин).

Таким образом, продолжительность клеточного цикла, рассчитанная тремя различными методами, составила 27,1 (Приложение 1.1), 28,2 и 27,64 ч или в среднем 27,65 ч (27 ч 39 мин), а продолжительность S-фазы, рассчитанная двумя различными методами, – 10,77 и 10,56 ч или в среднем 10,67 ч (10 ч 40 мин).

1.3. Определение продолжительности фазы G₂ в клетках культуры XL2. Для клеток линии XL2 минимальная, средняя и максимальная продолжительность G₂-фазы, рассчитанная по методу «меченых митозов», составила 1 ч 38 мин, 2 ч 04 мин и 3 ч 42 мин соответственно. Средняя продолжительность G₂, рассчитанная по методу «меченых профаз», составила 2 ч 27 мин (2,45 ч).

1.4. Определение продолжительности митоза в клетках культуры XL2. Прижизненные наблюдения клеток XL2 показали, что общая продолжительность митоза составила в среднем 54,1 мин (0,9 ч) при средней продолжительности профазы,

прометафазы, метафазы, анафазы и телофазы 5,7, 6,7, 19,4, 5,7 и 16,6 мин соответственно [44].

1.5. Определение продолжительности фазы G_1 в клетках культуры XL2. Для XL2-клеток продолжительность G_1 -фазы была определена вычитанием суммарной продолжительности всех остальных стадий клеточного цикла из общей продолжительности клеточного цикла. Продолжительность G_1 в клетках XL2 составила: $G_1 = T - S - M - G_2 = 27,65 - 10,56 - 0,90 - 2,1 = 14,09$ ч.

Приложение к главе 2.

Синхронизация клеток культуры XL2

Для пресинхронизации (снижения доли клеток в S-фазе перед началом синхронизации клеток афидиколином) было опробовано несколько способов: охлаждение клеток до 9° , инкубация в среде без сыворотки и предварительная дополнительная инкубация в среде с афидиколином.

Охлаждение клеток (180 ч) приводило к существенному снижению доли клеток в S-фазе (с 38,2 до 9,4%) и повышению доли клеток в G_0 (38,6% спустя 31 ч после переноса клеток в нормальные условия культивирования (25°)). Из полученных данных ясно, что охлаждение клеток не может быть использовано для пресинхронизации, поскольку выход клеток в цикл после перенесения в нормальные условия культивирования — замедленный и несинхронный.

Отсутствие сыворотки в среде культивирования приводило к прогрессивному выходу клеток из цикла. При этом доля клеток в S-фазе снижалась не равномерно, а волнообразно, что связано, вероятно, с различной чувствительностью к такому воздействию клеток различных фаз клеточного цикла. Было установлено, что первый минимум доли клеток в S-фазе наблюдался через 24 ч после перенесения их в среду без сыворотки и составлял в среднем $\sim 10\%$. Таким образом, инкубация в течение 24 ч в среде без сыворотки привела к частичной синхронизации клеток в G_1 -фазе (или к обратимому выходу части из них в G_0 -фазу).

К аналогичным результатам привела и пресинхронизация афидиколином в течение 30 ч с последующей отмывкой в течение 15 ч в полной среде перед синхронизацией второй обработкой афидиколином.

По совокупности двух принципиальных параметров — минимальной доли клеток в S-фазе и, возможно, более быстрого возвращения клеток в цикл — оптимальным методом пресинхронизации для клеток XL2 оказалась 24-часовая инкубация в среде без сыворотки. Двойная

синхронизация афидиколином также дала удовлетворительный результат, но при этом время эксперимента было существенно больше.

Важный вопрос, когда начинать инкубацию клеток в среде без сыворотки — сразу после пересева, в логарифмической стадии роста или в монослое? Как известно, после пересева клеток доля делящихся клеток растет, достигая равновесного состояния в логарифмической стадии роста. Далее, при достижении сомкнутого монослоя доля клеток в G_0 повышается. Таким образом, при каждом пересеве клеток происходит циклическое изменение соотношения делящихся и неделящихся клеток. Было показано [44], что оптимальным является начало инкубации в среде без сыворотки после пересева клеток, в день достижения ими сомкнутого монослоя. При этом первые 3 ч клетки инкубировались в полной среде, что необходимо для их нормального прикрепления, а также для полной инактивации сывороткой используемого для пересева версена (0,05%-ный EDTA на фосфатно-солевом буфере).

Следующий протокол синхронизации клеток XL2 был разработан для получения популяций клеток, обогащенных клетками в G_1 -, S-, G_2 -фазах и митозе.

Клетки вырастили до конфлуентного монослоя, сняли с помощью смеси трипсина и версена, стряхнули с матраса, ресуспендировали в полной среде и рассадили одновременно на пластиковые матрасы и покровные стекла в концентрации ~ 600 клеток на 1 мм^2 . Спустя 3 ч, когда клетки прикрепилась, среду трижды отмыли теплым PBS (Phosphate Buffered Saline) (25°) и заменили средой без сыворотки на 24 ч. После этого клетки перенесли в полную среду с 40 мкМ афидиколином и инкубировали в течение 30 ч. Далее афидиколин отмывали теплым PBS (25°) и клетки культивировали в полной среде. Популяция клеток с максимальной долей клеток в S-фазе была получена спустя 2 ч, с максимальной долей клеток в G_2 -фазе — спустя 9–11 ч после отмывания афидиколина. В последнем случае проводили микроскопический контроль чистоты популяции для предупреждения «загрязнения» этой фракции митотическими клетками — клетки были использованы для биохимического исследования немедленно после обнаружения первого митоза.

Клетки на покровных стеклах фиксировали во всех принципиальных точках эксперимента и каждый час после отмывания афидиколина. После иммунофлуоресцентной окраски антителами к BrdU подсчитывали процент клеток в S-фазе и митотический индекс (1000–5000 клеток на 1 точку).

Продолжительность фаз S и G₂ достаточно вариабельна, поэтому после отмывания афидиколина происходит прогрессивная рассинхронизация и для получения популяции с высокой долей митотических клеток необходимо было использовать дополнительные обработки. Через 8 ч после начала отмывания афидиколина, т.е. еще до того, как первые синхронизированные клетки дошли до митоза, в среду культивирования был добавлен нокодазол в конечной концентрации 0,5 мкг/мл или ALLN (40 мкг/мл). Оба эти вещества задерживают клетки в митозе, но механизм задержки различен (см. главу 2). Было показано, что оптимальным методом является двустадийная синхронизация по следующей схеме: сначала клетки инкубировались 3 ч в среде с нокодазолом (0,5 мкг/мл), а затем еще 4 ч в среде, содержащей одновременно нокодазол (0,5 мкг/мл) и ALLN (40 мкг/мл). В этом случае удалось предотвратить полиплоидизацию клеток, характерную для синхронизации только нокодазолом и вместе с тем добиться полного блока митоза, что невозможно при использовании только ALLN.

После отмывания нокодазола и ALLN в течение 20 мин (четырежды по 5 мин) свежей средой была получена фракция клеток, в которой митотические клетки составляли более 70% клеток пролиферативного пула.

Популяцию клеток с максимальной долей в G₁ получали инкубацией клеток в полной среде в течение 10 ч после отмывания смеси нокодазола и ALLN [45, 101].

Приложение к главе 3.

Результаты расчета доли клеток различных фаз цикла во фракциях синхронизированных клеток культуры XL2

Описанный выше протокол синхронизации, позволил получить четыре популяции синхронизированных клеток следующего состава: «**max G₁**» (85,6% G₁; 11,9% S; 1,9% G₂; 0,7% M); «**max S**» (7,7% G₁; 92,3% S; 0% G₂; 0% M); «**max G₂**» (0% G₁; 18,2% S; 77,2% G₂; 4,6% M); «**max M**» (12,1% G₁; 13,5% S; 3,4% G₂; 71,7% M) (подробнее см. работу [101]).

Приложение к главе 4.

Изучение сравнительного уровня экспрессии β-тубулина, ДНК-топоизомеразы 2α, pEg2, XIEg5, pEg7 (XCAP D2) и XCAP-E в клеточном цикле на синхронизированных клетках XL2

С помощью количественного иммуноблоттинга было определено сравнительное содержание в исследуемых фракциях шести различных белков: β-тубулина, ДНК-топоизомеразы 2α, киназы семейства Аврора А (pEg2), кинезин-подобного белка-мотора XIEg5 и белков конденсинового комплекса pEg7 (XCAP D2) и XCAP-E [101, 102]. Уровни в клеточном цикле остальных белков были отнесены к уровню β-тубулина в соответствующей фракции. При этом отношение во фракции с максимальным содержанием клеток в G₁ («**max G₁**») было принято за единицу. Относительный уровень белков конденсинового комплекса мало менялся в ходе клеточного цикла, в то время как уровни ДНК-топоизомеразы 2α, XIEg5 и особенно pEg2 имели тенденцию к росту от G₁ к митозу. При сравнительном анализе «митотической» фракции смешанного состава с фракцией «**max G₁**» было показано различие в уровне белка pEg2 в 15,44 раза [102]. Однако ясно, что при таких различиях содержания белка в клетках разных стадий клеточного цикла «загрязнение» фракции клеток «**max G₁**» даже небольшим количеством клеток других фаз существенно меняет результат. Это было прямо показано при пересчете сравнительного содержания этого белка для гипотетически «чистых» фракций. Действительная разница уровней pEg2 между митозом и G₁ составила 40,08 раз [101]. Эти данные лучше соответствуют результатам, полученным при иммуноцитохимическом анализе этого centrosомального белка в интерфазе и митозе [103–105]. Уровень pEg2 циклически меняется в клеточном цикле — он деградирует в течение 1 ч после митоза [104] и начинает вновь синтезироваться в клетках в конце S-фазы клеточного цикла [105].

Для белков, уровень которых мало меняется в ходе клеточного цикла, различия при анализе смешанных и чистых фракций невелики, как, например, для белков конденсинового комплекса XCAP E и pEg7 [101].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Howard, A., and Pelc, S.R. (1953) *Heredity Suppl.*, **6**, 261–273.
- Zetterberg, A., and Larsson, O. (1995) in *Cell Cycle Control* (Hutchison, C., and Glover, D., eds), IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 205–227.
- Lajtha, L.G. (1963) *J. Cell Compar. Physiol.*, **62**, 143–145.
- Quastler, H. (1963) *Cell Proliferation*, Blackwell, Oxford.
- Mendelsohn, M.L. (1960) *Science*, **132**, 1496.
- Kisieleski, W.E., Baserga, R., and Lisco, H. (1961) *Atompraxis*, **7**, 81–85.

7. Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983) *Cell*, **33**, 389–396.
8. Norbury, C., and Nurse, P. (1992) *Annu Rev. Biochem.*, **61**, 441–470.
9. Епифанова О.И. (1997) *Лекции о клеточном цикле*, Товарищество научных изданий КМК, Москва.
10. Nurse, P. (2000) *Cell*, **100**, 71–78.
11. Bravo, R., Fey, S.J., Bellatin, J., Larsen, P.M., and Celis, J.E. (1982) *Prog. Clin. Biol. Res.*, **85** (Pt A), 235–248.
12. Mathews, M.B., Bernstein, R.M., Franza, B.R., Jr., and Garrels, J.I. (1984) *Nature*, **309**, 374–376.
13. Zimmerman, A.M., Zimmerman, S., Thomas, J., and Ginzburg, I. (1983) *FEBS Lett.*, **164**, 318–321.
14. Weisenberg, R.C. (1972) *J. Cell Biol.*, **54**, 266–278.
15. Hinchcliffe, E.H., Li, C., Thompson, E.A., Maller, J.L., and Sluder, G. (1999) *Science*, **283**, 851–854.
16. Lacey, K.R., Jackson, P.K., and Stearns, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2817–2822.
17. Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J., and Nigg, E.A. (1999) *Nature Cell Biol.*, **1**, 88–93.
18. Uzbekov, R., Kireev, I., and Prigent, C. (2002) *Biol. Cell*, **94**, 275–288.
19. Dawson, K.B., Madoc-Jones, H., and Field, F.G. (1965) *Exp. Cell Res.*, **38**, 75–84.
20. Сахаров В.Н., Воронкова Л.Н. (1993) *Цитология*, **35**, 79–85.
21. Узбеков Р.Э., Арле-Боннемэ Я., Шартран И., Филипп М. (1998) *Биол. мембр.*, **15**, 614–622.
22. Nias, A.H.W., and Fox, M. (1971) *Cell Tissue Kinet.*, **4**, 375–398.
23. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*, 3rd ed., W.H. Freeman and Co., N.Y.
24. Quastler, H., and Sherman, F.G. (1959) *Exp. Cell Res.*, **17**, 420–438.
25. Ley, K.D., and Tobey, R.A. (1970) *J. Cell Biol.*, **47**, 453–459.
26. Zielke, H.R., and Littlefield, J.W. (1974) *Methods Cell Biol.*, **8**, 107–121.
27. Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H., and Mano, Y. (1978) *Nature (London)*, **275**, 458–460.
28. Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M., and McIntosh, J.R. (1980) *Exp. Cell Res.*, **126**, 397–405.
29. Pardee, A.B. (1989) *Science*, **246**, 603–608.
30. Lalande, M. (1990) *Exp. Cell Res.*, **186**, 332–339.
31. Pardee, A.B., and Keyomarsi, K. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **4**, 186–191.
32. Sherwood, S.W., Kung, A.L., Roitelman, J., Simoni, R.D., and Schimke, R.T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3353–3357.
33. Yerly-Motta, V., Pavy, J.J., and Herve, P. (1998) *Biotech. Histochem.*, **74**, 119–128.
34. Xeros, N. (1962) *Nature (London)*, **194**, 682.
35. Tobey, R.A., Petersen, D.F., Anderson, E.C., and Puck, T.T. (1966) *Biophys. J.*, **6**, 567–581.
36. Bostock, C.J., Prescott, D.M., and Kirkpatrick, J.B. (1971) *Exp. Cell Res.*, **68**, 163–168.
37. Stein, G.S., and Borun, T.W. (1972) *J. Cell Biol.*, **52**, 292–307.
38. Stein, G.S., Stein, J.L., Lian, J.B., Last, T.J., Owen, T.A., and McCabe, L. (1998) in *Cell Biology: a Laboratory Handbook*, 2nd ed., vol. 1, Academic Press, N.Y., pp. 253–260.
39. Kasten, F.H., Strasser, F.F., and Turner, M. (1965) *Nature (London)*, **207**, 161–164.
40. Pedrali-Noy, G., and Spadari, S. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 1194–1202.
41. Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Miller-Faures, A., Miller, A.O., Kruppa, J., and Koch, G. (1980) *Nucl. Acids Res.*, **8**, 377–387.
42. Matherly, L.H., Schuetz, J.D., Westin, E., and Goldman, I.D. (1989) *Anal. Biochem.*, **182**, 338–345.
43. Fox, M.H., Read, R.A., and Bedford, J.S. (1987) *Cytometry*, **8**, 315–320.
44. Uzbekov, R., Chartrain, I., Philippe, M., and Arlot-Bonnemains, Y. (1998) *Exp. Cell Res.*, **242**, 60–68.
45. Uzbekov, R., Prigent, C., and Arlot-Bonnemains, Y. (1999) *Micr. Res. Tech.*, **45**, 31–42.
46. Lonn, U., and Lonn, S. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3996–3999.
47. Iliakis, G., Nusse, M., and Bryant, P. (1982) *Int. J. Radiat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **42**, 417–434.
48. Cordeiro-Stone, M., and Kaufman, D.G. (1985) *Biochemistry*, **24**, 4815–4822.
49. Radford, I.R., and Broadhurst, S. (1988) *Int. J. Radiat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **53**, 205–215.
50. D'Anna J.A., Crissman, H.A., Jackson, P.J., and Tobey, R. (1985) *Biochemistry*, **24**, 5020–5026.
51. Reichard, P., and Ehrenberg, A. (1983) *Science*, **221**, 514–519.
52. Nakamura, M., Saito, H., Ebinuma, H., Wakabayashi, K., Saito, Y., Takagi, T., Nakamoto, N., and Ishii, H. (2001) *J. Cell Physiol.*, **187**, 392–401.
53. Johnson, R.T., Downes, C.S., and Meyn, R.E. (1993) in *The Cell Cycle. A Practical Approach* (Fantes, P., and Brooks, R., eds), Oxford University Press, N.Y., pp. 1–24.
54. Urbani, L., Sherwood, S., and Schimke, R.T. (1995) *Exp. Cell Res.*, **219**, 159–168.
55. Keyomarsi, K., Sandoval, L., Band, V., and Pardee, A.B. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 3602–3609.
56. Wu Jia-Rui, and Gilbert, D.M. (2000) *FEBS Lett.*, **484**, 108–112.
57. Jakobisiak, M., Bruno, S., Skierski, J.S., and Darzynkiewicz, A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3628–3632.
58. Stryer, L. (1981) *Biochemistry*, 2nd ed., W.H. Freeman and Co., San Francisco.
59. Yunis, J.J. (1976) *Science*, **191**, 1268–1270.
60. Pai, G.S., and Tomas, G.H. (1980) *Hum. Genet.*, **54**, 41–45.
61. Mosca, P.J., Dijkwel, P.A., and Hamlin, R.N. (1992) *Mol. Cell Biol.*, **12**, 4375–4383.
62. Gilbert, D.M., Neilson, A., Miyazawa, H., DePamphilis, M.L., and Burhans, W.C. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 9597–9606.
63. Kalejta, R.F., and Hamlin, J.L. (1997) *Exp. Cell Res.*, **231**, 173–183.
64. Hoffman, B.D., Hanauske-Abel, H.M., Flint, A., and Lalande, M. (1991) *Cytometry*, **12**, 26–32.
65. De Brabander, M.J., van de Veire, R.M.L., Aerts, F.E.M., Borgers, M., and Janssen, P.A.J. (1976) *Cancer Res*, **36**, 905–916.
66. Quintart, J., Bartholeyns, J., and Baudhuin, P. (1979) *Biochem. J.*, **184**, 133–141.
67. Rieder, C.L., and Cole, R. (2000) *Curr. Biol.*, **10**, 1067–1070.
68. Nusse, M., and Egner, H.J. (1984) *Cell Tissue Kinet.*, **17**, 13–23.
69. Kwon, T.K., Buchholz, A., Chrest, F.J. and Nordin, A.A. (1996) *Cell Growth Differ.*, **7**, 1305–1313.
70. Schnier, J.B., Nishi, K., Goodrich, D.W., and Bradbury, E.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5941–5946.
71. Courage, C., Snowden, R., and Gescher, A. (1996) *Br. J. Cancer*, **74**, 1199–1205.
72. Shimizu, E., Zhao, M.R., Nakanishi, H., Yamamoto, A., Yoshida, S., Takada, M., Ogura, T., and Sone, S. (1996) *Oncology*, **53**, 494–504.
73. Swe, M., Bay, B.H., and Sit, K.H. (1996) *Cancer Lett.*, **104**, 145–152.

74. Temin, H. (1971) *J. Cell Physiol.*, **78**, 161–170.
75. Pardee, A.B. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1286–1290.
76. Prescott, D.M. (1976) *Reproduction of Eukaryote Cells*, Acad. Press, N.Y.
77. Niki, T., Rombouts, K., De Bleser, P., de Smet, K., Rogiers, V., Schuppan, D., Yoshida, M., Gabbiani, G., and Geerts, A. (1999) *Hepatology*, **29**, 858–867.
78. Yoshida, M., and Beppu, T. (1988) *Exp. Cell Res.*, **177**, 122–131.
79. Jackson, R.S. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 7440–7446.
80. De Braekeleer, M., Keushnig, M., and Lin, C.C. (1985) *Can. J. Genet. Cytol.*, **27**, 622–625.
81. Lalande, M., and Hanauske-Abel, H.M. (1990) *Exp. Cell Res.*, **188**, 117–121.
82. Jue, S.G., Dawson, G.W., and Brogden, R.N. (1985) *Drugs*, **29**, 330–341.
83. Tournier, F., Karsenti, E., and Bornens, M. (1989) *Dev. Biol.*, **136**, 321–329.
84. Chen, G., and Hitomi, M. (1999) *Exp. Cell Res.*, **249**, 327–336.
85. Shall, S. (1973) *Methods Cell Biol.*, **7**, 269–285.
86. Mitchell, B.F., and Tupper, J.T. (1977) *Exp. Cell Res.*, **106**, 351–355.
87. Kaiser, N., Bourne, H.R., Insel, P.A., and Coffino, P. (1979) *J. Cell Phys.*, **101**, 369–374.
88. Gilbert, D.M., and Cohen, S.N. (1987) *Cell*, **50**, 59–68.
89. Monahan, J.J. (1976) in *Methods in Cell Biology*, vol. 14, (Prescott, D.M., ed.), Academic Press, N.Y., pp. 105–111.
90. Rice G.C., Dean P.N., Gray J.W., and Dewey W.C. (1984) *Cytometry*, **5**, 289–298.
91. Crissman, H.A., and Tobey, R.A. (1974) *Science*, **184**, 1297–1298.
92. Vindelov, L.L., Christensen, I.J., and Nissen, N.I. (1983) *Cytometry*, **3**, 328–331.
93. Burhans, W.C., Vassilev, L.T., Caddle, M.S., Heintz, N.H., and DePamphilis, M.L. (1990) *Cell*, **62**, 955–965.
94. Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M., and Gray, J.W. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5573–5577.
95. Gorbsky, G.J. (1994) *Cancer Res.*, **54**, 1042–1048.
96. Kamensky, L.A., and Kamensky, L.D. (1991) *Cytometry*, **12**, 381–387.
97. Kamensky, L.A., Burger, D.E., Gershman, R.J., Kamensky, L.D., and Luther, E. (1997) *Acta Cytol.*, **41**, 123–143.
98. Епифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. (1977) *Радиоавтография*, Высшая школа, Москва.
99. Gratzner, H.G. (1982) *Science*, **218**, 474–475.
100. Воробьев И.А., Надеждина Е.С. (1987) *Итоги науки и техники. Общие проблемы физико-химической биологии*, том 7 (под ред. Ченцова Ю.С.), ВИНТИ, Москва, с. 1–164.
101. Узбеков Р.Э. (2004) *Цитология*, **45**, 249–256.
102. Uzbekov, R.E., Timirbulatova, E.R., Watrin, E., Cubizolles, F., Ogereau, D., Gulak, P., Legagneux, V., Polyakov, V.Ju., Le Guellec, K., and Kireev, I. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 1667–1678.
103. Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Le Guellec, R., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M., and Prigent, C. (1998) *J. Cell Sci.*, **111**, 157–172.
104. Arlot-Bonnemains, Y., Klotzbucher, A., Giet, R., Uzbekov, R., Bihan, R., and Prigent, C. (2001) *FEBS Lett.*, **508**, 149–152.
105. Uzbekov, R.E., Giet, R., Arlot-Bonnemains, Y., and Prigent, C. (2001) *Biol. Cell*, **93**, 337.

ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION LEVEL DYNAMICS IN THE CELL CYCLE USING SYNCHRONIZED CELLS

R. E. Uzbekov

*Cell Cycle Group, Division of Electron Microscopy,
A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov
Moscow State University, Moscow 119992 ; fax: (7-095) 939-3181,
E-mail: rustzbekov@aol.com*

Received June 18, 2003

Revision received September 15, 2003

Study of cell cycle dynamics of protein expression level demands the preparation of relatively pure fractions of cells in different phases of the cycle. For this aim, various methods of cell synchronization have been developed. However, successful cell synchronization is impossible without knowledge of the duration of all phases of the cell cycle. Therefore both themes are considered together in this review. In the first part of the review the principal methods of analysis of cell cycle phase durations are briefly described. In the second part different methods of cells synchronization are summarized. The third part is devoted to a description of methods of analysis of cells fraction composition after synchronization. In the fourth part, the technique of studying protein expression level in the cell cycle using quantitative immunoblotting of fractions of synchronized cells is described. The general theoretical statements presented in this work are illustrated in the Appendix with examples of cell cycle analysis, synchronization, and studying of dynamics of expression level of some proteins which have been performed on synchronized cells of the XL2 (*Xenopus laevis*) line.

Key words: cell cycle, proteins, cell synchronization