

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ СИНХРОНИЗАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ДЕЛЕНИЙ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

© А. С. Жук,^{1,2,*} Е. И. Степченкова,^{1,2} Ю. И. Павлов,³ С. Г. Инге-Вечтомов^{1,2}

¹ С.-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Санкт-Петербург, 199034, Россия,

² С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034, Россия, и

³ Медицинский центр университета штата Небраска, Омаха, 68198, США;

* электронный адрес: ania.zhuk@gmail.com

Синхронизацию клеточных делений в культурах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* широко используют в исследованиях, посвященных изучению регуляции экспрессии генов и биохимических процессов у эукариот на разных стадиях клеточного цикла. В данной работе мы сравнили эффективность современных наиболее часто используемых методов достижения и оценки степени синхронизации клеточных делений у дрожжей. На основе литературных и собственных данных в работе сформулированы практические рекомендации по синхронизации клеточных делений *S. cerevisiae* с помощью химических агентов (α -фактора, гидроксимочевина и нокодазол), а также генетического блока (температурно-чувствительной мутации *cdc28-4*).

Ключевые слова: синхронизация клеточных делений, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, α -фактор, гидроксимочевина, нокодазол, *cdc28-4*, проточная цитометрия.

Синхронизация клеточных культур является незаменимым приемом для изучения регуляции пролиферации клеток, экспрессии генов, посттрансляционной модификации белков, метаболических путей, систем репарации и других процессов на различных стадиях клеточного цикла. Активность этих процессов существенно меняется от стадии к стадии. В связи с этим для изучения регуляции различных процессов важно использовать однородный материал, т. е. культуры, в которых абсолютное большинство клеток находится на определенной стадии клеточного цикла (Hartwell, 1974; Singer, Johnston, 1981; Spellman et al., 1998; Gerald et al., 2002). В растущей культуре дрожжей можно обнаружить клетки, находящиеся на всех стадиях G₁, S, G₂ и M (Hartwell, 1974; Manukyan et al., 2011). В некоторых условиях может иметь место преобладание клеток одной из стадий над всеми остальными. Например, при ограничении питательных веществ (Williamson, Scopes, 1961; Tian et al., 2012) или при длительной инкубации дрожжевых культур до достижения ими глубокой стационарной фазы 80 % клеток могут переходить в стадию G₀ (Egilmez et al., 1990; Tian et al., 2012).

В настоящее время разработано довольно много различных методов, позволяющих получать культуры дрожжей, синхронизированные на любой стадии клеточного цикла. Синхронизированными называют культуры, в которых не менее 95 % клеток находятся на одной стадии клеточного цикла, а синхронность перехода из одной стадии в другую сохраняется в течение одного или нескольких клеточных циклов. Для синхронизации дрожжевых культур используют два принципиально различных под-

хода (Manukyan et al., 2011). Первый заключается в физическом разделении несинхронизированной культуры на фракции, состоящие из клеток, которые находятся на одной стадии клеточного цикла. В основу второго подхода положено использование таких воздействий на клетки, которые приводят к остановке клеточного цикла на определенной стадии и как следствие — синхронизации культуры.

Для физического выделения фракции клеток, находящихся на одной стадии клеточного цикла, применяют центрифугирование либо в градиенте плотности лактозы или декстрина, либо с применением специальных разделяющих роторов (Walker, 1999). При этом дрожжевые клетки разделяют по размеру: большие клетки остаются в нижней части ротора, а мелкие клетки без почек, имеющие меньшую плотность, собираются в верхней камере ротора (Walker, 1999). Легкая фракция дрожжевых клеток дает начало синхронной культуре (Day et al., 2004). Разделение клеток центрифугированием с применением специальных разделяющих роторов считается одним из наиболее физиологичных методов синхронизации дрожжевых культур, поскольку использование этого метода не нарушает рост и деление клеток (Walker, 1999; Day et al., 2004). Тем не менее этот подход имеет ряд ограничений. Во-первых, для разделения клеток с помощью центрифугирования требуется специальный дорогостоящий ротор. Дополнительные ограничения накладывает то, что фракция клеток, находящихся на одной стадии в несинхронизированной культуре, обычно невелика, поэтому получение синхронизированных клеток в количестве, достаточном для масштабных, например биохимических

исследований, затруднено. Эффективность синхронизации физическими методами можно повысить, используя культуры клеток, находящихся в стационарной фазе, или предварительно охлажденные культуры (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011).

Другой подход для синхронизации *S. cerevisiae* основан на использовании агентов или мутаций, которые блокируют клеточный цикл на определенной стадии. С помощью дрожжевых феромонов, химических ингибиторов и температурно-чувствительных мутаций в гене циклинзависимой киназы дрожжевые клетки могут быть синхронизированы на различных стадиях клеточного цикла. Например, обработка клеток α -фактором или внесение температурно-чувствительных мутаций *cdc28-4* или *cdc28-13* приводит к остановке клеточного цикла на стадии G_1 (Cho et al., 1998; Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), обработка гидроксимочевинной — к остановке на стадии S (Galli, Schiestl, 1996; Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), мутации *cdc31-2* и *mps2-1* блокируют клеточный цикл на стадии G_2 (Weiss, Winey, 1996). В присутствии нокодазола происходит остановка на стадии перехода G_2/M , мутация *cdc15-2* приводит к синхронизации в анафазе—телофазе митоза (Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011).

Обработка клеток α -фактором считается одним из наиболее удобных способов синхронизации клеточных делений у дрожжей, поскольку в этом случае достигается высокая степень синхронизации, которая сохраняется 2—3 клеточных цикла (Breedon, 1997; Futcher, 1999; Endo et al., 2010). Гаплоидные дрожжевые клетки *S. cerevisiae*, принадлежащие одному из двух типов спаривания (α или a), синтезируют пептидные феромоны — a - и α -факторы соответственно (Naberg, 2012). Гаплоидные клетки противоположных типов спаривания могут копулировать с образованием диплоидов. Гибридизация возможна только в том случае, если обе копулирующие клетки находятся на стадии G_1 клеточного цикла. Клетки типа спаривания a секретируют во внешнюю среду a -фактор, который связывается с рецептором на поверхности клеток α -типа спаривания. Клетки типа спаривания α синтезируют α -фактор, который взаимодействует с рецептором на поверхности a -клеток (Naberg, 2012). Связывание феромона с рецепторами на поверхности клеток обоих типов спаривания приводит к ингибированию активности циклинзависимой киназы Cln/Cdc28 (Peter, Herskowitz, 1994) и синхронизации клеток на стадии G_1 . Клетки типа спаривания a удлиняются и вступают в копуляцию с клетками типа спаривания α . Клетки типа спаривания α , которые не вступили в гибридизацию, освобождаются от блока клеточного цикла, индуцированного α -фактором, посредством Bar-фактора. Мутации в гене *BAR1*, кодирующем Bar-фактор, вызывают сверхчувствительность клеток типа спаривания a к действию α -фактора. Поэтому для синхронизации штаммов типа спаривания a , несущих делецию *bar1 Δ* , рекомендуют использовать α -фактор в концентрации в десятки раз ниже, чем для штамма дикого типа, а синхронизация у мутантов *bar1 Δ* может сохраняться дольше (Futcher, 1999). Дрожжевые клетки, синхронизированные α -фактором на стадии G_1 , имеют округлую или грушевидную форму без почек, а количество ДНК в них соответствует гаплоидному набору хромосом или пику 1N на гистограмме, полученной с помощью проточной цитометрии (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011).

Гидроксимочевина ингибирует фермент рибонуклеотид-редуктазу, который контролирует реакцию биосинте-

за дезоксирибозид-дифосфатов из соответствующих рибонуклеотидов. Обработка клеток дрожжей гидроксимочевинной приводит к голоданию по предшественникам ДНК, репликация замедляется, что вызывает блок клеточного цикла на стадии S (Galli, Schiestl, 1996; Day et al., 2004; Кос et al., 2004). Клетки, заблокированные гидроксимочевинной на стадии S, имеют маленькие или средних размеров почки, а содержание ДНК в них соответствует положению между пиками 1N и 2N на диаграмме, полученной с помощью проточной цитометрии (Manukyan et al., 2011). Гидроксимочевина в концентрации 100 мМ повышает частоту возникновения мутаций в 10 раз по сравнению со спонтанным уровнем (Northam et al., 2010). Поэтому при синхронизации гидроксимочевинной необходимо учитывать риск возникновения нежелательных мутаций.

Нокодазол синхронизирует дрожжевые клетки на стадии перехода G_2 —M, ингибируя полимеризацию микротрубочек (Jacobs et al., 1988; Day et al., 2004; Argueso et al., 2008; Endo et al., 2010; Ma et al., 2011). Клетки, синхронизированные нокодазолом, имеют крупные почки, количество ДНК в клетке соответствует пику 2N (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011).

Температурно-чувствительная мутация *cdc28-4* нарушает активность циклинзависимой протеинкиназы Cdc28 при 37 °C, что препятствует переходу клеток дрожжей из стадии G_1 в стадию S и приводит к синхронизации клеток на стадии G_1 (Reed, 1980; Reed, Wittenberg, 1990). Протеинкиназа Cdc28 регулирует образование почек и клеточный цикл, осуществляя не только переход из стадии G_1 в S, но и из G_2 в M, путем взаимодействия с циклинами Cln и Clb (Reed, Wittenberg, 1990; Surana et al., 1991; Mendenhall, Hodge, 1998; Ahn et al., 2001). Активация белка Cdc28 циклинами Cln1, Cln2 и Cln3 в стадии G_1 запускает процесс поляризации актинового цитоскелета, а в стадии G_2 активация белка Cdc28 циклинами Clb1 и Cln2 вызывает деполаризацию актинового цитоскелета (Lew, Reed, 1993, 1995). Большинство известных мутаций *cdc28* приводит к остановке клеток на стадии G_1 , но есть исключение — мутация *cdc28-1N*, блокирующая клетки на стадии G_2 (Ahn et al., 2001). Метод синхронизации, основанный на использовании мутаций *cdc*, является эффективным, однако его следует применять с осторожностью из-за плейотропных проявлений мутаций, способных повлиять на результаты эксперимента. Клетки *cdc28-4* на стадии G_1 не имеют почек, обладают увеличенным размером (Reed, 1980) и удлиненной формой по сравнению с клетками *cdc28-4* при 22 °C (Cid et al., 2001; Yu et al., 2008). Показано, что для клеток с мутацией *cdc28-4*, заблокированных на стадии G_1 , характерна деполаризация актинового цитоскелета, что сопровождается увеличением размера клеток и изменением их морфологии (Goranov et al., 2013). Изменение морфологии связано с тем что при инактивации киназы Cln/Cdc28 в стадии G_1 происходит нарушение распределения актина в клеточном цикле (Lew, Reed, 1993). Горанов и соавторы (Goranov et al., 2009) детально изучили причины изменения морфологии клеток с мутацией *cdc28-4*. Они показали, что мутантные клетки *cdc* продолжают увеличиваться в размерах в течение 2—8 ч после начала воздействия повышенной температуры 37 °C. Увеличение объема клеток *cdc28-4* связывают с непрекращающимся после остановки клеточного цикла белковым синтезом (Goranov et al., 2009). В пользу этого говорит тот факт, что у мутанта *cdc28-4* при 37 °C аминокислоты, меченные радиоактивной меткой, продолжали

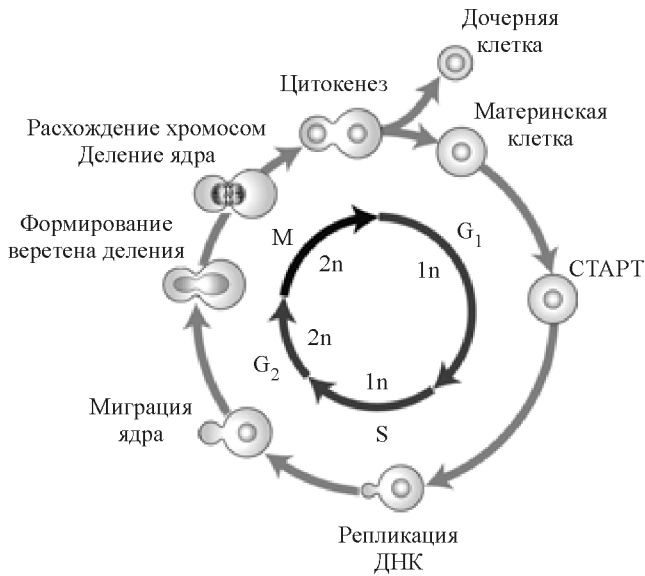


Рис. 1. Клеточный цикл гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

встраиваться в белки по меньшей мере в течение 4 ч. Добавление азидо (ингибитора синтеза аденозинтрифосфата), циклогексимида, рапамицина (ингибиторов белкового синтеза) или латрункулина А (токсина, деполимеризующего актиновый цитоскелет) в заблокированную на стадии G_1 культуру клеток *cdc28-4* приводило к быстрому прекращению увеличения объема клеток. На рост клеток мутантов *cdc28-4* также влияют источники углерода. Увеличение объема клеток происходило быстрее в присутствии сахаров и быстрее на глюкозе, чем на рафинозе. Полагают, что увеличение размера клеток *cdc28-4*, происходящее при 37 °С, связано с нарушением регуляции ключевых генов рибосомных белков, которые участвуют в контроле роста клетки (Goranov et al., 2009).

Применение химических агентов и температурно-чувствительных мутаций в отличие от метода синхронизации с помощью центрифугирования вызывает остановку клеточного цикла на определенной стадии, однако может приводить к изменению морфологии клеток и вызывать специфические эффекты, не свойственные нормальному течению клеточного цикла (Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011). Естественным ингибитором клеточного цикла является α -фактор, тогда как химические агенты гидроксимочевина и нокодазол нарушают многие молекулярные и биохимические процессы в клетке и обладают токсичным эффектом, различные мутации *cdc* вызывают остановку клеточного цикла за счет отсутствия продуктов соответствующих генов. Поскольку у мутантов *cdc* после остановки клеточного цикла продолжается увеличение объема клеток, вероятно, не все клеточные процессы, специфичные для данной стадии, заблокированы, кроме того, некоторые мутации *cdc* нарушают работу белков теплового шока (Breedon, 1997; Futcher, 1999). Тем не менее методы, основанные на применении блокирующих агентов и температурно-чувствительных мутаций, очень распространены, поскольку они не требуют специального дорогостоящего оборудования и позволяют быстро получать большое число синхронизированных клеток, что часто необходимо во многих биохимических исследованиях. В то же время у такого подхода по сравнению с физическим методом есть важное

преимущество: при использовании блокирующих агентов клетки остаются на одной стадии клеточного цикла до тех пор, пока сохраняется воздействие синхронизирующего агента. При использовании физических методов синхронизации отобранные клетки продолжают движение по клеточному циклу, что может привести к десинхронизации клеточных делений в процессе длительной подготовки материала к эксперименту. Все это следует учитывать при выборе способа синхронизации в соответствии с задачами исследования.

Для оценки степени синхронизации *S. cerevisiae* чаще всего используют два метода — микроскопию и проточную цитометрию (Haase, Lew, 1997; Calvert et al., 2008; Manukyan et al., 2011). С помощью микроскопии степень синхронизации оценивают по морфологии клеток. Клетки гаплоидных гетероталлических штаммов *S. cerevisiae*, находящиеся на стадии G_1 , имеют округлую форму без почек (рис. 1). Появление небольшой почки свидетельствует о переходе клетки в раннюю стадию S. Наличие более крупной почки свидетельствует о переходе дрожжевой клетки в стадию G_2 или M (рис. 1) (Calvert et al., 2008; Manukyan et al., 2011). Применяя микроскопию, затруднительно определить, в какой стадии находятся дрожжевые клетки с большой почкой, которую могут иметь клетки в поздней стадии S, стадии G_2 или M. Поэтому микроскопию сочетают с флуоресцентным окрашиванием ДНК ядра (Futcher, 1999). Форма и положение ядра позволяют более точно определять стадии клеточного цикла у *S. cerevisiae* (Futcher, 1999), так можно различать клетки на поздних стадиях S и переходе из G_2 в M. Тем не менее поскольку нарушение физиологических процессов, используемое для синхронизации, неизбежно сказывается на морфологии клеток, микроскопия не всегда позволяет достоверно оценить степень синхронизации культуры, поэтому проточная цитометрия является более информативной. Проточная цитометрия позволяет по степени флуоресценции и световой дисперсии, которая возникает при прохождении клетки, меченной флуоресцентными красителями, через лазерный луч в струе жидкости, определить размер и форму клетки, а также количество ДНК в ней (Haase, Lew, 1997; Haase, Reed, 2002). Важное преимущество проточной цитометрии перед микроскопией для анализа степени синхронизации клеточной культуры состоит в более высокой точности, поскольку с помощью первого метода можно проанализировать десятки тысяч клеток за несколько минут, что существенно превышает возможности микроскопии.

Столкнувшись с необходимостью получения синхронных культур дрожжей *S. cerevisiae*, мы обнаружили, что далеко не все протоколы синхронизации клеток дрожжей эффективны. При использовании некоторых из них синхронизация не наступала вообще или была частичной. В нашей работе мы провели анализ наиболее популярных методов синхронизации клеток *S. cerevisiae* с помощью химических веществ и генетического блока клеточного цикла.

Материал и методика

Штаммы и условия культивирования. В работе использовали гаплоидные штаммы гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: E1000 (*MATa ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3, 112 his3-11,15 GAL ura3::URA3/GPD-TK7x*) (Lengronne et al., 2001); E134 (*MATa ura3-52*

leu2-3,112 trp1-289 his7-2 ade5-1 lys2::InsEA14) (Shcherbakova, Kunkel, 1999); $\Delta 1$ -*bar1* (*MATa his7-2 leu2A::kanMX ura3A trp1-282 ade2-1 lys 2AGG2899-2900 bar1::hygB*), полученный на фоне штамма $\Delta 1(-2)$ -7B-YUNI300 путем изгнания фактора [PSI⁺] и внесения мутации *bar1::hygB* (Pavlov et al., 2002); K5-35B-D924 (*MATa ura3 leu2 lys5::kanMX met15*) (Степченко и др., 2009); K5-35B-D924-cdc28-4 (*MATa ura3A leu2A met15A lys5::kanMX cyh cdc28-4*). Введение мутации *cdc28-4* в штамм K5-35B-D924 осуществляли методом вставки-выщепления (pop-in/pop-out) (Rothstein, 1991). Источником мутации *cdc28-4* служила интегративная плазмида pTB1, содержащая фрагмент *cdc28-4* с нуклеотидными заменами C382T и C384T, что приводит к аминокислотной замене H128Y в соответствующем белке (Lorincz, Reed, 1986; McDonald et al., 2005). Плазмида pTB1 была любезно предоставлена д-ром Эвардом Винтером (Университет Томаса Джефферсона, США).

Дрожжи выращивали на полной среде YEPD при 30 °C. Штамм с мутацией *cdc28-4* выращивали на полной среде YEPD при 22 °C. Все жидкие и твердые среды готовили по стандартным протоколам (Rose et al., 1990).

Процедура синхронизации. Для синхронизации штаммов типа спаривания а клетки обрабатывали α -фактором (Zymo Research, США) в финальной концентрации 100 мкМ (для штамма дикого типа) и 5 мкМ для штамма *bar1A*. Для синхронизации штаммов типа спаривания α использовали гидроксимочевину (Sigma, США) в финальной концентрации от 200 до 400 мМ, нокодазол (Sigma, США) в финальной концентрации 15 или 30 мкг/мл. Нокодазол растворяли в диметилсульфоксиде (DMCO).

Дрожжевые культуры выращивали до ранней логарифмической стадии $(0.2\text{—}0.5) \cdot 10^7$ кл./мл в жидкой среде YEPD. В случае синхронизации нокодазолом клетки выращивали в жидкой среде YEPD, содержащей 1% DMCO. Это позволяет улучшить эффективность действия нокодазола (Day et al., 2004). На следующий день ночную культуру клеток разводили в 10 раз свежей жидкой средой YEPD и растили еще 2—4 ч. Затем добавляли химический агент для синхронизации и инкубировали 3 ч на качалке при 30 °C. Дрожжевые клетки отмывали от синхронизирующих агентов. Для этого суспензию клеток центрифугировали при 4000 g в течение 3—5 мин, надосадочную жидкость удаляли, а клетки ресуспендировали в теплой (30 °C) жидкой среде YEPD, процедуру повторяли дважды. Клетки ресуспендировали в 1 мл жидкой среды YEPD в финальной концентрации примерно $(0.5\text{—}1.0) \cdot 10^7$ кл./мл. Для определения числа клеточных циклов, в течение которых сохраняется синхронизация после отмывки от синхронизирующих агентов, дрожжевые клетки растили еще 9 ч, отбирая по 1 мл суспензии клеток $((0.5\text{—}1.0) \cdot 10^7$ кл./мл) через 1, 2, 3, 6 и 9 ч. Для синхронизации штаммов с мутацией *cdc28-4* дрожжевую культуру выращивали при 22 °C, а затем переносили в 37 °C и инкубировали при повышенной температуре 2—4 ч.

Подготовка образцов для проточной цитометрии. Для проточной цитометрии использовали 1 мл суспензии, содержащей $(0.5\text{—}1.0) \cdot 10^7$ кл./мл. Клетки, отобранные в различные промежутки времени после начала воздействия синхронизирующего фактора, собирали центрифугированием при 1500 g в течение 3 мин, промывали в том же объеме стерильной воды, для фиксации клеток к ним приливали 1 мл 70%-ного этанола, пе-

ремешивали и инкубировали 1 ч при комнатной температуре или ночь при 4 °C. Затем клетки отмывали стерильной водой, для этого образцы центрифугировали при 10 000 об/мин в течение 5 с, осадок ресуспендировали в 0.7—1.0 мл воды, затем снова центрифугировали. Осадок ресуспендировали в 0.5—0.7 мл раствора рибонуклеазы А (РНказы) (2 мг/мл РНказы в 50 мМ Трис, pH 8.0) и инкубировали в течение 6—15 ч при 37 °C. Затем к суспензии дрожжевых клеток добавляли 30—50 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали 1 ч при 50 °C. Клетки собирали центрифугированием (10 000 об/мин, 5 с) и ресуспендировали в 0.5 мл 50 мМ Трис, pH 7. Такие препараты клеток можно хранить при 4 °C несколько дней. Далее 50 мкл раствора суспензии клеток добавляли в 1 мл раствора с флуоресцентным красителем SYBR GREEN I, который окрашивает ДНК клеток (Haase, Reed, 2002). Краситель SYBR GREEN I разводили в 10 000 раз в растворе 50 мМ Трис pH 7.5. Полученные образцы обрабатывали ультразвуком и инкубировали при 4 °C в темноте 10 мин, а затем анализировали на приборе FACSCalibur или BD accuri C6.

Микроскопия препаратов, окрашенных флуоресцентным красителем DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол). Окраску ядерной ДНК живых дрожжевых клеток проводили с использованием реагента Vectashield Mounting Medium с DAPI согласно протоколу фирмы-производителя Vector Laboratories. Флуоресцентный анализ образцов проводили на микроскопе Leica DM 6000B Leica Microsystems GmBH с использованием системы анализа Leica QWin Standard V3.2.0. Флуоресценцию анализировали, используя компонент «А» с запирающим фильтром 425 нм и возбуждающим фильтром 340 нм.

Результаты

Мы проверили эффективность наиболее часто используемых протоколов синхронизации клеток дрожжей (Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), основанных на использовании химических агентов (α -фактора, гидроксимочевины и нокодазола), а также температурно-чувствительной мутации *cdc28-4*. Эффективность синхронизации оценивали методом проточной цитометрии по наличию на диаграмме, полученной этим методом, единственного пика флуоресценции, соответствующего количеству ДНК 1N или 2N в большинстве клеток.

Синхронизация α -фактором. Результаты, отражающие степень синхронизации культуры штамма E1000 при обработке клеток α -фактором, представлены на рис. 2. В случае отрицательного контроля (без добавления блокирующего агента) клетки культуры делятся асинхронно, что проявляется наличием двух пиков на диаграмме, полученной с помощью проточной цитометрии (рис. 2, а). В этом случае в культуре примерно в равном количестве представлены клетки, находящиеся на стадиях G₁ и G₂ (пики 1N и 2N соответственно). Мы показали, что стандартная концентрация α -фактора 5—10 мкг/мл, рекомендуемая в методических пособиях по синхронизации дрожжевых культур (Futcher, 1999; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), не всегда эффективна. Обработка клеток α -фактором в стандартной концентрации 10 мкг/мл не приводит к синхронизации клеток штамма E1000, несущего аллель *BAR1* дикого типа и

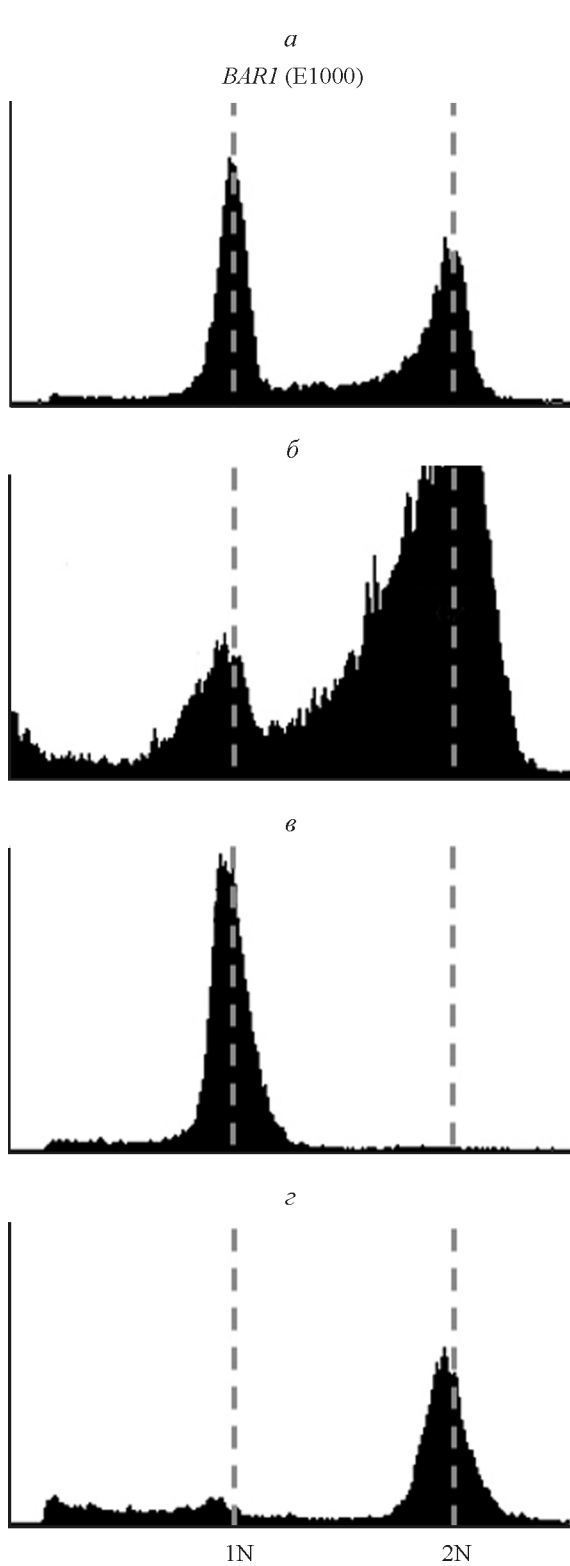


Рис. 2. Оценка степени синхронизации клеток дрожжевого штамма *BARI* (E1000) при воздействии α -фактора.

a — клетки, не обработанные α -фактором; *б* — клетки после обработки α -фактором в концентрации 10 мкг/мл в течение 3 ч; *в* — воздействие α -фактора в концентрации 166 мкг/мл в течение 3 ч; *г* — клетки через 1 ч после отмывки от α -фактора.

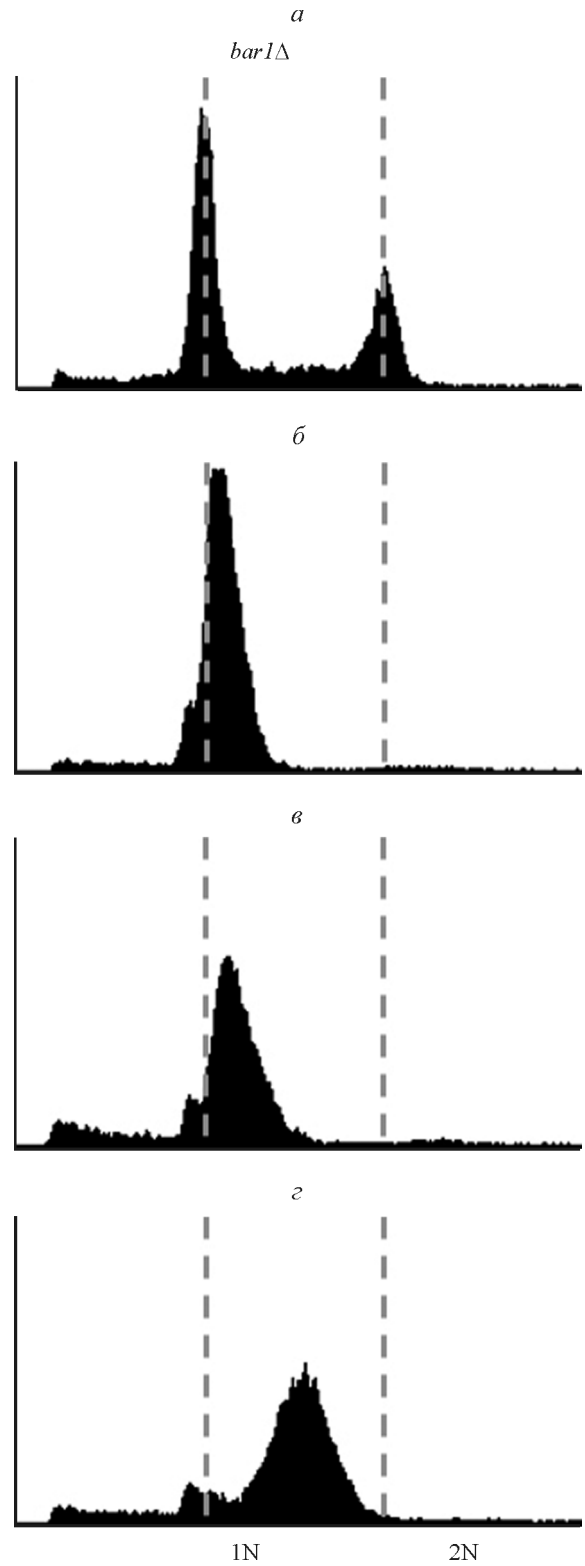


Рис. 3. Оценка степени синхронизации дрожжевых клеток с мутацией *bar1Δ* после обработки α -фактором.

a — без воздействия α -фактора; *б* — воздействие α -фактора в концентрации 8.3 мкг/мл в течение 3 ч; *в*, *г* — культуры штамма $\Delta 1\text{-}bar1$ через 1 и 6 ч после отмывки от α -фактора соответственно.

являющегося производным штамма W303 (рис. 2, б), штамма, который часто используют в стандартных протоколах для синхронизации α -фактором (Futcher, 1999; Day et al., 2004). Синхронизация культур штамма E1000 на стадии G_1 наступала при увеличении концентрации α -фактора до 166 мкг/мл (рис. 2, в), синхронизация при этом сохранялась в течение 1 ч после отмывки клеток от α -фактора, когда абсолютное большинство клеток культуры синхронно перешло из стадии G_1 в стадию G_2 (рис. 2, г). Культуры штамма $\Delta 1\text{-bar1}$ синхронизировались на стадии G_1 при концентрации α -фактора 8.3 мкг/мл (рис. 3, б) и сохраняли синхронизацию в течение 2—3 клеточных циклов (рис. 3, в, г). Таким образом, рекомендуемая в литературе концентрация α -фактора 5—10 мкг/мл оказалась достаточной только для синхронизации штамма $\text{bar1}\Delta$, в то время как для синхронизации штамма BAR1 концентрация α -фактора должна быть значительно выше.

Синхронизация гидроксимочевинной. Для экспериментов по проверке эффективности синхронизации гидроксимочевинной мы использовали два штамма — K5-35-D924 и E134. Результаты по оценке эффективности синхронизации с помощью гидроксимочевинной представлены на рис. 4. Гидроксимочевина не синхронизирует штамм K5-35B-D924 в стандартной концентрации 200 мМ (рис. 4, б), рекомендованной в большинстве методик по синхронизации (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011). Повышение концентрации гидроксимочевинной до 2000 мМ также не приводило к синхронизации штамма K5—35B-D924 (рис. 4, в). Нам удалось добиться синхронизации культуры другого штамма — E134 — на стадии G_1 при обработке клеток гидроксимочевинной в концентрациях 200 и 400 мМ (рис. 4, ж, з). Полученные результаты отличаются от ожидаемых, поскольку в большинстве протоколов по синхронизации обработку гидроксимочевинной рекомендуют проводить для синхронизации на стадии S (Galli, Schiestl, 1996; Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011). Синхронизация клеток 200 мМ гидроксимочевинной на стадии G_1 была продемонстрирована в одной работе (Nur et al., 2011).

Синхронизация нокодазолом. Для экспериментов по проверке эффективности синхронизации нокодазолом мы использовали два штамма — K5-35-D924 и E134. Нокодазол не синхронизировал оба штамма ни в стандартной концентрации (15 мкг/мл), описанной в методиках по синхронизации дрожжевых культур (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), ни при двукратном увеличении его концентрации до 30 мкг/мл (рис. 4, г, д, и, к). Дальнейшее увеличение дозы нокодазола приводило к снижению выживаемости и гибели дрожжевых клеток.

Синхронизация с использованием температурно-чувствительной мутации *cdc28-4*. Известно, что дрожжевые клетки с мутацией *cdc28-4* при 37 °C имеют измененную морфологию. Поскольку морфологические нарушения потенциально способны влиять на результаты проточной цитометрии, мы с помощью микроскопии изучили фенотип мутанта *cdc28-4*, полученного нами на фоне штамма K5-35B-D924. Клетки штамма K5-35B-D924-*cdc28-4* при 37 °C приобретают более удлиненную форму по сравнению с клетками того же штамма при 22 °C (рис. 5). Клетки с мутацией *cdc28-4* крупнее клеток дикого типа, часто слипаются, а образовавшиеся почки не всегда отделяются от материнской клетки (рис. 5). Таким образом, мы получили данные, согласующиеся с ранее опубликованными (Yu et al., 2008; Goranov

et al., 2009). Мы также наблюдали, что у клеток *cdc28-4* после инкубации при 37 °C при их окрашивании DAPI происходит окрашивание не только ядерной, но и митохондриальной ДНК. Чем дольше клетки подвергались действию повышенной температуры, тем больше окрашенной ДНК митохондрий мы наблюдали. Это может быть связано с тем, что для мутантов *cdc28-4* в перемиссивных условиях характерны изменение морфологии митохондрий и их фрагментация (Neutzner, Youle, 2005). Мы показали, что плотность клеточной культуры *cdc28-4* после перемещения ее из 22 в 37 °C продолжает увеличиваться в течение 6 ч, а затем не меняется. Время удвоения клеток с мутацией *cdc28-4* при 22 °C составило около 4 ч.

При 22 °C культура мутантного штамма *cdc28-4* не синхронизируется и не отличается от культуры штамма дикого типа по соотношению клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла (рис. 6, а, г). Наши результаты, полученные с помощью проточной цитометрии, показывают, что синхронизация клеток *cdc28-4* наступает при 37 °C (рис. 6, д), поскольку при повышенной температуре наблюдается единственный пик на диаграммах проточной цитометрии. Эксперименты по проверке степени синхронизации с помощью проточной цитометрии показали, что для синхронизации клеток *cdc28-4* необходимо повышение температуры на 2—4 ч, а после снятия блокирующего клеточный цикл воздействия путем перенесения культуры в 22 °C синхронизация сохраняется как минимум еще одно клеточное деление (рис. 6, е).

Обсуждение

В данной работе мы сравнили эффективность общепринятых методов синхронизации клеточных делений в дрожжевых культурах. Эти методы опубликованы в нескольких сборниках протоколов по синхронизации дрожжевых культур — Cell Cycle Checkpoint Control Protocols и Cell Cycle Synchronization Methods and Protocols (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011), а также были описаны в ряде статей (Singer, Johnston, 1981; Jacobs et al., 1988; Breeden, 1997; Futcher, 1999; Koc et al., 2004). Во всех методических пособиях по синхронизации дрожжевых культур авторы указывают, что обработка α -фактором, гидроксимочевинной и нокодазолом приводит к синхронизации клеточных делений, однако возможность варьирования их эффективности в зависимости от генотипического фона используемых штаммов не обсуждается (Day et al., 2004; Manukyan et al., 2011). Согласно полученным нами данным, эти методики не всегда эффективны. Лучшей воспроизводимостью результатов, по нашим экспериментальным и литературным данным, обладает метод синхронизации клеток дрожжей с помощью α -фактора. Тем не менее даже в этом случае необходимо подбирать концентрацию α -фактора, поскольку эффективная концентрация может различаться для различных штаммов в 50 раз. Также необходимо помнить, что этот подход можно использовать только для гаплоидных штаммов, имеющих тип спаривания а и не несущих мутации по генам, которые кодируют рецепторы к феромону или контролируют передачу сигнала (Breeden, 1997). Для синхронизации штаммов типа спаривания α может оказаться эффективным применение α -фактора, механизм действия которого аналогичен механизму действия α -фактора

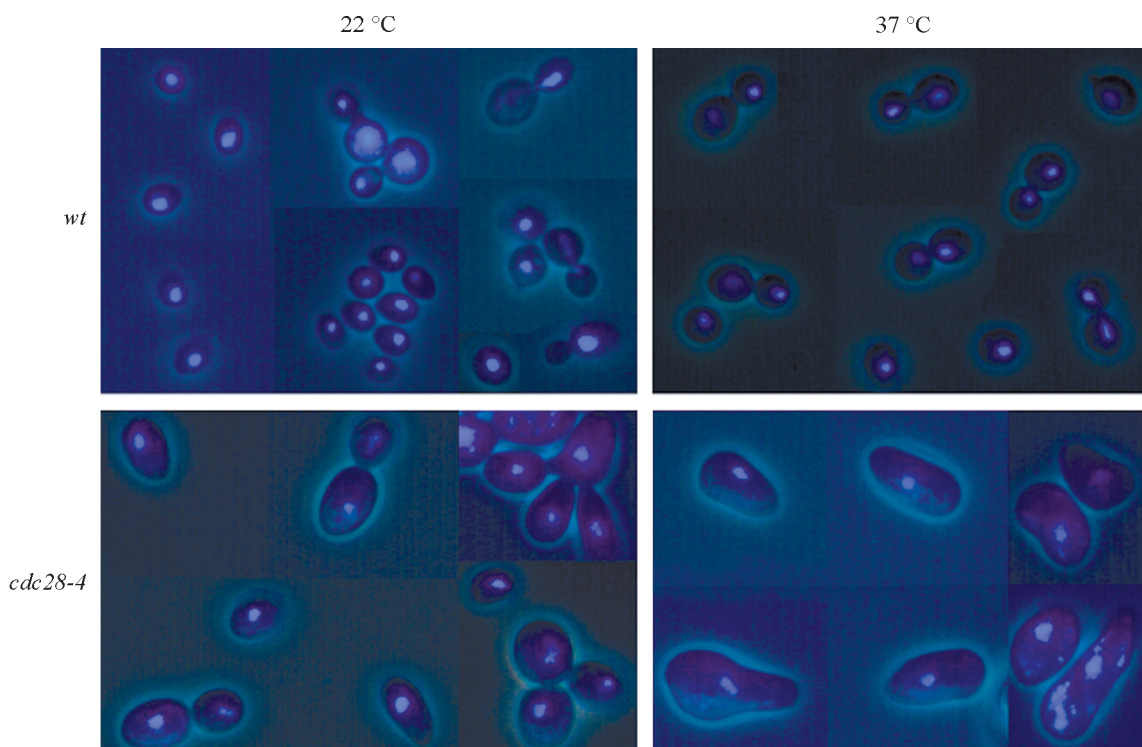


Рис. 5. Живые клетки штаммов *wt* и *cdc28-4*, окрашенные флуоресцентным красителем DAPI.

Все фотографии получены при одинаковом увеличении (об. 100×).

(Michaelis, Herskowitz, 1988; Fujimura, 1990). Этот метод не является распространенным, возможно ввиду отсутствия коммерчески доступного α -фактора. В литературе мы обнаружили один пример использования α -фактора для синхронизации дрожжей. Исследовательской группой из Лондона в 2012 г. был разработан протокол синтеза α -фактора и продемонстрирована успешная синхронизация клеток типа спаривания α в стадии G_1 α -фактором (O'Reilly et al., 2012). Авторы использовали α -фактор в концентрации на порядок меньшей, чем стандартная концентрация α -фактора.

Мы показали, что синхронизация гидроксимочевинной возможна, но в значительной мере зависит от генотипического фона используемого штамма. Так, обработка клеток штамма K5-35B-D924 гидроксимочевинной в стандартной концентрации не приводила к синхронизации. При использовании другого штамма — E134 — нам удалось синхронизировать клетки на стадии G_1 , но не на стадии S, как описано в литературе. В случае необходимости получения синхронизированной культуры именно в стадии S мы рекомендуем применять последовательную обработку клеток двумя факторами — сначала α -фактором, а затем гидроксимочевинной (Weiss, Winey, 1996; Falbo et al., 2009).

В литературе имеются разрозненные сведения об эффективности синхронизации нокодазолом. Для использованных нами штаммов обработка нокодазолом оказалась неэффективной. Возможно, необходимо подбирать такую

концентрацию нокодазола, которая приводит к синхронизации, но не оказывает значительного токсического эффекта и не снижает выживаемость клеток. Ранее было показано, что успешная синхронизация нокодазолом наступала при концентрации 2 мг/мл (Argueso et al., 2008), что значительно превышает рекомендуемую стандартную концентрации в 15 мкг/мл. Для синхронизации дрожжевых клеток в стадии G_2/M можно порекомендовать перед обработкой нокодазолом проводить предварительную синхронизацию α -фактором (Gerald et al., 2002; Endo et al., 2010). Обработка нокодазолом не всегда эффективна для клеток не только дрожжей, но и млекопитающих (Cooper et al., 2006).

Синхронизация с применением мутации *cdc28-4* эффективна и сохраняется несколько клеточных циклов. Тем не менее этот метод синхронизации приводит к значительным морфологическим изменениям. Поэтому невозможно быть уверенным, что после перенесения культуры в перmissive температуру (22 °C) восстановятся все процессы, характерные для нормального течения клеточного цикла (Breedon, 1997). Применение мутации *cdc28-4* может быть ограничено в исследованиях, посвященных изучению уровня экспрессии генов на разных стадиях клеточного цикла. Это связано с тем, что после снятия синхронизирующего воздействия уровень экспрессии изучаемых генов может не соответствовать уровню, характерному для нормального клеточного цикла (Shedden, Cooper, 2002).

Рис. 4. Оценка степени синхронизации клеток дрожжей штаммов K5-35-D924 (a—d) и E-134 (e—k) при воздействии гидроксимочевинной и нокодазола.

a, e — отрицательный контроль — соответствующие штаммы без обработки гидроксимочевинной или нокодазолом; б, ж — клетки, обработанные гидроксимочевинной, 200 мМ; в — гидроксимочевинной, 2000 мМ; з — гидроксимочевинной, 400 мМ; з, u — нокодазолом, 15 мкг/мл; д, к — нокодазолом, 30 мкг/мл.

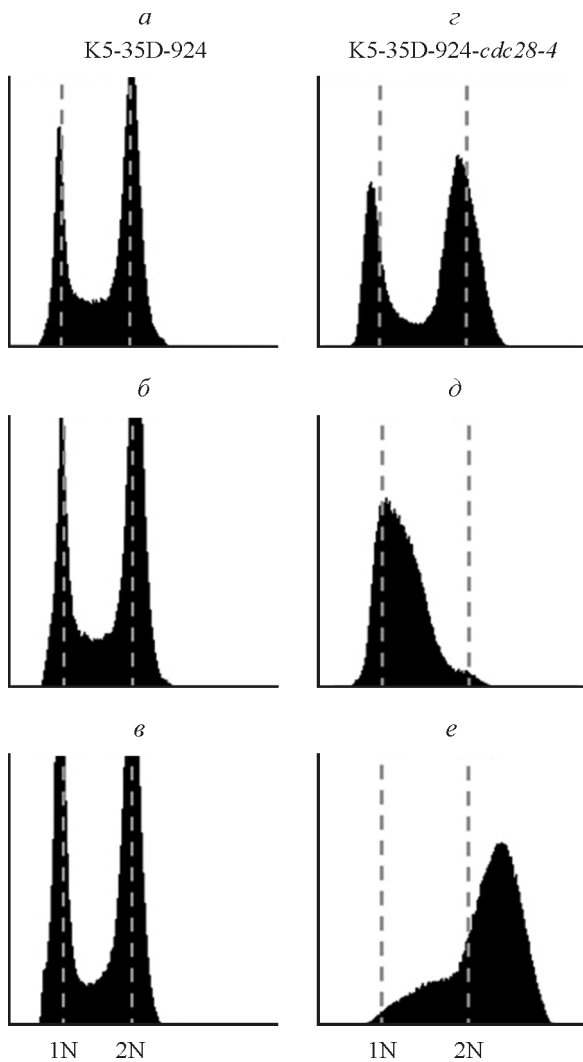


Рис. 6. Оценка степени синхронизации клеток дрожжей штаммов K5-35 D-924 (а—в) и K5-35 D-924-*cdc28-4* (з—е) с помощью проточной цитометрии.

Ночную культуру клеток разводили в 10 раз и растили 2—4 ч при различной температуре: а, з — 2 ч при 22 °С; б, д — 4 ч при 37 °С; в, е — 4 ч при 37 °С с последующей инкубацией при 22 °С в течение 2 ч.

Таким образом, универсального метода, который подходил бы для синхронизации любых дрожжевых штаммов, не существует. При выборе методов синхронизации следует учитывать особенности дрожжевых штаммов, применяемых в исследовании, а эффективность синхронизации необходимо подтверждать с помощью проточной цитометрии или микроскопии, что делают не всегда. Для этого достаточно точным методом является проточная цитометрия, которая позволяет оценить количество клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, по содержанию в них ДНК. Оценка степени синхронизации с помощью микроскопии по морфологии в сочетании с окраской ядра флуоресцентными красителями в некоторых случаях значительно затруднена из-за сильного изменения морфологии синхронизированных дрожжевых клеток (рис 5). Помимо проточной цитометрии и микроскопии для оценки эффективности синхронизации можно использовать другие методы: например, это можно делать по уровню экспрессии генов, которые имеют только один пик проявления в клеточном цикле (Cho

et al., 1998; Spellman et al., 1998; Futcher, 1999). Таких генов у дрожжей обнаружено более 800 (Cho et al., 1998; Spellman et al., 1998). Например, уровень экспрессии *CLN2* наибольший в стадии G₁, *H2A* — в стадии S, *CLB4* — в G₂, *CLB2* — в M, и *EGT2* — на границе стадий M—G₁ (Spellman et al., 1998). Примером успешного применения этого подхода является работа, посвященная оценке эффективности синхронизации α-фактором, с помощью центрифугирования и внесения мутаций по генам циклинзависимых протеинкиназ *CDC15* и *CDC28* (Spellman et al., 1998; Shedden, Cooper, 2002). В этой работе было показано, что при синхронизации и α-фактором, а также у мутантов *cdc15-2* и *cdc28-13* синхронность деления клеток сохраняется дольше 2—3 клеточных циклов, при этом наблюдались постоянные и четкие сигналы экспрессии репортерных генов (Spellman et al., 1998; Shedden, Cooper, 2002). Разделение центрифугированием обеспечивало синхронизацию не более чем на один клеточный цикл, а сигнал экспрессии репортерных генов оказался менее четким, чем в предыдущем случае (Spellman et al., 1998; Shedden, Cooper, 2002).

Контроль клеточного цикла осуществляется множеством генов и зависит от многих внешних факторов. Поэтому при использовании различных методов синхронизации клеточных делений у дрожжей естественным образом могут возникать трудности с воспроизводимостью результатов в разных лабораториях. Перед проведением экспериментов с синхронизированными культурами обязательным этапом должна стать предварительная оценка эффективности избранного метода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-08625), гранта СПбГУ (№ 1.38.426.2015) и Российского научного фонда (проект 14-50-00069).

Список литературы

- Степченкова Е. И., Коченова О. В., Инге-Вечтомов С. Г. 2009. «Незаконная» гибридизация и «незаконная» цитодукция у гетероталлических дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как система для анализа генетической активности экзогенных и эндогенных факторов в «α-тесте». Вестн. СПбГУ. 3 (4) : 129—140. (Stepchenkova E. I., Kochenova O. V., Inge-Vechtomov S. G. 2009. «Illegitimate» mating and «illegitimate» cytoduction in heterothallic yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a system for analysis of genetic activity of exogenic and endogenic factors in «α-test». Vestnik of St. Petersburg University. 3 (4) : 129—140.)
- Ahn S. H., Tobe B. T., Fitz Gerald J. N., Anderson S. L., Acurio A., Kron S. J. 2001. Enhanced cell polarity in mutants of the budding yeast cyclin-dependent kinase Cdc28p. Mol. Biol. Cell. 12 : 3589—3600.
- Argueso J. L., Westmoreland J., Mieczkowski P. A., Gawel M., Petes T. D., Resnick M. A. 2008. Double-strand breaks associated with repetitive DNA can reshape the genome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105 : 11 845—11 850.
- Breeden L. L. 1997. Alpha-factor synchronization of budding yeast. Methods Enzymol. 283 : 332—341.
- Calvert M. E., Lannigan J. A., Pemberton L. F. 2008. Optimization of yeast cell cycle analysis and morphological characterization by multispectral imaging flow cytometry. Cytometry A. 73 : 825—833.
- Cho R. J., Campbell M. J., Winzeler E. A., Steinmetz L., Conway A., Wodicka L., Wolfsberg T. G., Gabrielian A. E., Landsman D., Lockhart D. J., Davis R. W. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. Mol. Cell. 2 : 65—73.

- Cid V. J., Adamikova L., Sanchez M., Molina M., Nombela C. 2001. Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology*. 147 : 1437—1450.
- Cooper S., Iyer G., Tarquini M., Bissett P. 2006. Nocodazole does not synchronize cells: implications for cell-cycle control and whole-culture synchronization. *Cell Tissue Res*. 324 : 237—242.
- Day A., Schneider C., Schneider B. L. 2004. Yeast cell synchronization. *Methods Mol. Biol.* 241 : 55—76.
- Egilmaz N. K., Chen J. B., Jazwinski S. M. 1990. Preparation and partial characterization of old yeast cells. *J. Gerontol.* 45 : B9—B17.
- Endo K., Mizuguchi M., Harata A., Itoh G., Tanaka K. 2010. Nocodazole induces mitotic cell death with apoptotic-like features in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 584 : 2387—2392.
- Falbo K. B., Alabert C., Katou Y., Wu S., Han J., Wehr T., Xiao J., He X., Zhang Z., Shi Y., Shirahige K., Pasero P., Shen X. 2009. Involvement of a chromatin remodeling complex in damage tolerance during DNA replication. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16 : 1167—1172.
- Fujimura H. 1990. Identification and characterization of a mutation affecting the division arrest signaling of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 124 (2) : 275—282.
- Futcher B. 1999. Cell cycle synchronization. *Methods Cell Sci.* 21 : 79—86.
- Galli A., Schiestl R. H. 1996. Hydroxyurea induces recombination in dividing but not in G₁ or G₂ cell cycle arrested yeast cells. *Mutat. Res.* 354 : 69—75.
- Gerald J. N., Benjamin J. M., Kron S. J. 2002. Robust G₁ checkpoint arrest in budding yeast: dependence on DNA damage signaling and repair. *J. Cell Sci.* 115 : 1749—1757.
- Goranov A. I., Cook M., Ricicova M., Ben-Ari G., Gonzalez C., Hansen C., Tyers M., Amon A. 2009. The rate of cell growth is governed by cell cycle stage. *Genes Develop.* 23 : 1408—1422.
- Goranov A. I., Gulati A., Dephore N., Takahara T., Maeda T., Gygi S. P., Manalis S., Amon A. 2013. Changes in cell morphology are coordinated with cell growth through the TORC1 pathway. *Curr. Biol.* 23 : 1269—1279.
- Haase S. B., Lew D. J. 1997. Flow cytometric analysis of DNA content in budding yeast. *Methods Enzymol.* 283 : 322—332.
- Haase S. B., Reed S. I. 2002. Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle*. 1 : 132—136.
- Haber J. E. 2012. Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 191 : 33—64.
- Hartwell L. H. 1974. *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* 38 : 164—198.
- Hur J. Y., Park M. C., Suh K. Y., Park S. H. 2011. Synchronization of cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* by using a cell chip platform. *Mol. Cell.* 32 : 483—488.
- Jacobs C. W., Adams A. E., Szanislo P. J., Pringle J. R. 1988. Functions of microtubules in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* 107 : 1409—1426.
- Koc A., Wheeler L. J., Mathews C. K., Merrill G. F. 2004. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* 279 : 223—230.
- Lengronne A., Pasero P., Bensimon A., Schwob E. 2001. Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucl. Acids Res.* 29 : 1433—1442.
- Lew D. J., Reed S. I. 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J. Cell Biol.* 120 : 1305—1320.
- Lew D. J., Reed S. I. 1995. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 5 : 17—23.
- Lorincz A. T., Reed S. I. 1986. Sequence analysis of temperature-sensitive mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* gene CDC28. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 4099—4103.
- Ma W., Westmoreland J. W., Gordenin D. A., Resnick M. A. 2011. Alkylation base damage is converted into repairable double-strand breaks and complex intermediates in G₂ cells lacking AP endonuclease. *PLoS Genet.* 7 : e1002059.
- Manukyan A., Abraham L., Dungrawala H., Schneider B. L. 2011. Synchronization of yeast. *Methods Mol. Biol.* 761 : 173—200.
- McDonald C. M., Cooper K. F., Winter E. 2005. The Ama1-directed anaphase-promoting complex regulates the Smk1 mitogen-activated protein kinase during meiosis in yeast. *Genetics*. 171 : 901—911.
- Mendenhall M. D., Hodge A. E. 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 1191—1243.
- Michaelis S., Herskowitz I. 1988. The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 1309—1318.
- Neutzner A., Youle R. J. 2005. Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280 : 18 598—18 603.
- Northam M. R., Robinson H. A., Kochenova O. V., Shcherbakova P. V. 2010. Participation of DNA polymerase zeta in replication of undamaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 184 : 27—42.
- O'Reilly N., Charbin A., Lopez-Serra L., Uhlmann F. 2012. Facile synthesis of budding yeast a-factor and its use to synchronize cells of alpha mating type. *Yeast*. 29 : 233—240.
- Pavlov Y. I., Newlon C. S., Kunkel T. A. 2002. Yeast origins establish a strand bias for replicational mutagenesis. *Mol. Cell.* 10 : 207—213.
- Peter M., Herskowitz I. 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science*. 265 : 1228—1231.
- Reed S. I. 1980. The selection of *S. cerevisiae* mutants defective in the start event of cell division. *Genetics*. 95 : 561—577.
- Reed S. I., Wittenberg C. 1990. Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 87 : 5697—5701.
- Rose M. D., Winston F., Hieter P. 1990. *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, New York. 198 p.
- Rothstein R. 1991. Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* 194 : 281—301.
- Shcherbakova P. V., Kunkel T. A. 1999. Mutator phenotypes conferred by MLH1 overexpression and by heterozygosity for mlh1 mutations. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 3177—3183.
- Shedden K., Cooper S. 2002. Analysis of cell-cycle gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* using microarrays and multiple synchronization methods. *Nucl. Acids Res.* 30 : 2920—2929.
- Singer R. A., Johnston G. C. 1981. Nature of the G₁ phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 3030—3033.
- Spellman P. T., Sherlock G., Zhang M. Q., Iyer V. R., Anders K., Eisen M. B., Brown P. O., Botstein D., Futcher B. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell.* 9 : 3273—3297.
- Surana U., Roberts H., Price C., Schuster T., Fitch I., Futcher A. B., Nasmyth K. 1991. The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell*. 65 : 145—161.
- Tian Y., Luo C., Lu Y., Tang C., Ouyang Q. 2012. Cell cycle synchronization by nutrient modulation. *Integr. Biol. (Camb.)*. 4 : 328—334.
- Walker G. M. 1999. Synchronization of yeast cell populations. *Methods Cell Sci.* 21 : 87—93.
- Weiss E., Winey M. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* 132 : 111—123.
- Williamson D. H., Scopes A. W. 1961. Synchronization of division in cultures of *Saccharomyces cerevisiae* by control of the environment. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* 11 : 217—242.
- Yu L., Qi M., Sheff M. A., Elion E. A. 2008. Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G₁ cyclin-dependent kinase. *Mol. Biol. Cell.* 19 : 1739—1752.

EVALUATION OF EFFECTIVENESS OF SYNCHRONIZATION METHODS OF CELL DIVISION
IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A. S. Zhuk,^{1,2,*} E. I. Stepchenkova,^{1,2} Yu. I. Pavlov,³ S. G. Inge-Vechtomov^{1,2}

¹ St. Petersburg Branch of N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, St. Petersburg, 199034, Russia,

² St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia and

³ University of Nebraska Medical Center, Omaha, 68198, USA;

* e-mail: ania.zhuk@gmail.com

Synchronization of cell division in cultures of yeast *Saccharomyces cerevisiae* is widely used in research on the regulation of gene expression and biochemical processes in eukaryotes at different stages of the cell cycle. Here, we compare the efficiency of modern most commonly used methods to achieve and assess the degree of synchronization of cell division in yeast. Block-and-release methods with alpha-factor, hydroxyurea, nocodazole, *cdc28-4* mutation are described in detail with practical notes.

Key words: synchronization, budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, alpha-factor, hydroxyurea, nocodazole, *cdc28-4*, flow cytometry.
