

# ИНДУКЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ, ВЫЗВАННАЯ ВВЕДЕНИЕМ СИНТЕЗИРОВАННОЙ *in vitro* МОДИФИЦИРОВАННОЙ мРНК ГЕНА *hTERT*

Э.Б. Дашинимев, кандидат биологических наук, Р.Р. Файзуллин,  
Чжан Мэн, И.А. Мучкаева, В.В. Терских, доктор биологических наук, профессор,  
Ю.В. Суханов, кандидат медицинских наук, А.В. Васильев, доктор биологических наук  
ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
E-mail: dashinimaev@gmail.com

*Технологии репрограммирования клеток человека без использования генетического модифицирования находят все большее применение в экспериментальной клеточной биологии. Одним из таких перспективных методов является введение синтезированной *in vitro* мРНК генов транскрипционных репрессирующих факторов. Авторами работы была синтезирована модифицированная мРНК гена каталитического компонента теломеразы человека (*hTERT*) и показано, что ее введение в клетки человека индуцирует кратковременную теломеразную активность. Данная стратегия может найти применение в будущем для безопасного увеличения пролиферативного потенциала различных культур клеток.*

**Ключевые слова:** теломераза, теломеразная активность, модифицированная мРНК, фибробласты кожи человека

## INTRODUCTION OF MODIFIED mRNA *hTERT*, CAUSES SHORT-TERM TELOMERASE ACTIVITY IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS

E.B. Dashinimaev, R.R. Faizullin, Zhang Meng, I.A. Muchkaeva, V.V. Terskikh, Y.V. Sukhanov, A.V. Vasiliev  
Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences.

*Reprogramming of human cells without genetic modification is increasingly used technology in experimental cell biology. One of these promising methods is the transfection of synthesized mRNA of transcription factors. In this study we synthesized a modified mRNA of the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) and it was shown that its introduction into human cells induces a short-term telomerase activity. This strategy can be used in the future to increase proliferative ability of the cell cultures, for different applications.*

**Key words:** telomerase, reprogramming, human skin fibroblasts

Технологии репрограммирования соматических клеток человека — перспективное направление в современной клеточной биологии с возможностью применения в перспективе в медицине. Репрограммируя клетки, исследователи планируют получать пациент-специфические клетки различных типов тканей, которые можно было бы использовать в заместительной клеточно-тканевой терапии. Так, широкую известность получили эксперименты по созданию индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека [12], по прямому репрограммированию фибробластов в нейроны [14], в гепатоциты [10], в клетки-предшественники крови [11], клеток печени — в инсулинпродуцирующие клетки [9]. Однако большинство подобных технологий используют стратегию вирусного введения генов репрессирующих транскрипционных факторов, что подразумевает встраивание этих генов в геном клеток-мишеней с последующей гиперэкспрессией. Использование полученных таким образом генно-модифицированных клеток в клинической практике вызывает известные опасения, поскольку ненаправ-

ленное введение генов повышает риск нежелательного мутагенеза. Решить эту проблему пытались коллективы исследователей во всем мире. Например, опубликованы работы по репрограммированию клеток человека при помощи полицистронных плазмидных векторов с временной экспрессией [5], модифицированных белков транскрипционных факторов, способных проходить через клеточную мембрану [6], а также векторов на основе вируса Сендай, чей жизненный цикл основан на РНК и исключает встраивание в геном [4]. Однако практически всем этим методам присущи различные недостатки, главным из которых является низкая эффективность репрограммирования (как правило, по сравнению с вирусной трансфекцией ниже на 2–3 порядка).

Выходом на новый уровень в этой области стали работы с введением в клетки мРНК генов транскрипционных факторов, синтезированных *in vitro* [17, 15]. Такой подход исключает использование каких-либо молекул ДНК при репрограммировании. Это позволяет избежать риска генетического

модифицирования и, что немаловажно, дает возможность полностью управлять экспрессией вводимого гена, так как время жизни введенной мРНК в клетке обычно не превышает 24–48 ч. А главное, эта технология повысила эффективность репрограммирования, которая стала в 100 раз выше, чем при использовании лентивирусной конструкции [15]. Этого удалось добиться благодаря применению модифицированных нуклеотидов в составе синтезированной мРНК, которые позволяют обойти внутриклеточные системы защиты от проникновения чужеродной РНК (interferon response genes – IFNA, IFNB, IFIT1, OAS1, PKR, RIG1), что в итоге положительно сказалось на времени жизни введенной мРНК в клетке, а также на уменьшении цитотоксического эффекта.

Каталитический компонент теломеразы, отвечающий за теломеразную активность и удлинение теломер в клетке, является перспективным геном для репрограммирования клеток человека. Ряд исследователей связывают реактивацию теломеразы и приобретение иммортализованного статуса с эффективностью репрограммирования соматических клеток человека [13, 18]. Одной из причин такой связи может служить функция теломеразы по регулированию эпигенетического профиля субтеломерных областей генома [8]. Также известно, что индукция теломеразной активности стимулирует пролиферацию клеток, что является дополнительным положительным фактором для репрограммирования.

В наших предыдущих работах показано, что предварительная активация теломеразы в фибробластах кожи человека способствует увеличению эффективности их репрограммирования [1]. Каталитический компонент теломеразы также представляет интерес как потенциальный целевой ген для генной терапии в медицине. Так, в недавно опубликованной работе получены положительные результаты по увеличению средней продолжительности жизни мышей при помощи вирусной терапии геном *TERT*, без увеличения риска злокачественного опухолеобразования [2].

Цель данной работы – разработать метод индукции управляемой теломеразной активности на основе введения синтезированной *in vitro* модифицированной мРНК гена *hTERT*. По нашему мнению, данный подход может быть использован для различных приложений в экспериментальной клеточной биологии. Кроме того, одной из наших целей была проверка возможности индуцированной теломеразной активности реактивировать эндогенную экспрессию теломеразы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Выделение и культивирование фибробластов кожи человека

Фибробласты выделяли из биоптата кожи взрослого человека с помощью механической дезагрегации и ферментативной обработки 0,1% коллагеназой I типа (Worthington, США) с последующей отмывкой и центрифугированием. Клетки культивировали в среде DMEM (Панэко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Nucclone, США), в стандартных культуральных условиях (5% CO<sub>2</sub>; температура +37°C). Пересев клеточных культур проводили по стандартной методике с использованием растворов Версена (Панэко, Россия) и Трипсин-ЭДТА (Панэко, Россия). Культура иммортализованных фибробластов кожи человека 1608-hT, обладающих стабильной экспрессией каталитического компонента теломеразы, была любезно предоставлена доктором Егоровым Е.Е. (ИМБ РАН).

### Синтез модифицированной мРНК

Матричная последовательность ДНК генов (open reading frame – ORF) *hTERT* и *EGFP* со старти- и стоп-кодонами была клонирована в плазмиду, с фланкированием ORF гена последовательностями нетранслируемых участков UTR1 (5'-конец) и UTR2 (3'-конец). В нетранслируемом участке UTR1 находится T7-промотор, с помощью которого осуществляется реакция синтеза РНК T7-полимеразой. Далее ДНК-матрицу вместе с UTR1 и UTR2 амплифицировали с помощью ПЦР, в ходе которой используются праймеры (см. таблицу). Один из них – с длинным (80 н.) тимидиновым участком, с помощью которого добавляется полиадениновый «хвост» к нашей синтезированной мРНК. Для ПЦР-амплификации матрицы с *hTERT* в смесь добавляли бетаин (1M). Для синтеза мРНК, помимо нуклеотид-трифосфатов АТФ и ГТФ, использовали модифицированные нуклеотиды 5-метилцитидин и псевдоуридин (TriLink Biotechnologies, США). Синтез мРНК с CAP-аналогом (NewEnglandBiolabs, США) проводили при помощи коммерческого

ДНК-ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ UTR1, UTR2, ПРЯМОГО И ОБРАТНОГО ПРАЙМЕРОВ

Объект	Последовательность
UTR1 (87bp)	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCA CTATAGGGAAATA AGAGAGAAAAGAAGAGTA AGAAGAAATATAAGAGCCACCATG
UTR2 (119bp)	TGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCAT GCCCTTCTTCTCCTTGCACCTGTACCTCT TGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTG AGGGTCTAGAACTAGTGTTCGACGC
Прямой праймер (27b)	TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG
Обратный праймер (109b)	T(80)CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA

набора HiScribe T7 InVitroTranscriptionkit (cat.No. E2030S, NewEnglandBiolabs), согласно протоколу, предложенному производителем. Полученную мРНК обрабатывали ДНК-азой (Ambion, США) для удаления ДНК-матрицы; далее проводили очистку мРНК на колонках с помощью коммерческого набора RNeasy Mini Elute Cleanup kit (Cat.No. 74204, QIAGEN). Анализ синтезированной мРНК осуществляли при помощи спектрофотометра BioPhotometer (Eppendorf, Германия) и стандартного агарозного гель-электрофореза.

#### **Трансфекция мРНК в клетки человека при помощи липофектамина**

Трансфекцию мРНК проводили в живые, растущие клетки. За 1 сут до трансфекции клетки пересевали в лунки 6- или 4-луночного планшета (Nunc) в концентрации 10 000 кл/см<sup>2</sup>. Непосредственно перед трансфекцией удаляли полную ростовую среду и промывали клетки бессывороточной средой DMEM (Gibco, США). Для введения мРНК в клетки использовали Lipofectamine RNimax Transfection Reagent, (Cat.No. 11668-027, Invitrogen) согласно протоколам, предложенным производителем. Результаты введения мРНК гена EGFP оценивали на проточном цитофлюориметре Beckman Coulter Cell Lab Quanta SC. Клетки снимали с подложки при помощи трипсин-ЭДТА, отмывали 2 раза в PBS и без фиксации анализировали на приборе.

#### **Иммуноцитохимическое окрашивание**

Клетки фиксировали 4% формальдегидом на PBS (Панэко, Россия) 30 мин при комнатной температуре, дважды промывали PBS. Пе-

ред окрашиванием антителами клетки в течение 1 ч обрабатывали блокирующим раствором (БР) (PBS+10%ЭТС+0,1%TritonX-100). Первые антитела наносили в разведении 1/50-1/100 в БР, инкубировали 2 ч при +37°C. Далее клетки отмывали 3 раза PBS и наносили вторые антитела в разведении 1/500 в БР. Инкубировали 1 ч при 37°C, потом отмывали 3 раза PBS. Затем препараты с клетками окрашивали раствором DAPI (1,5 мкг/мл на PBS, Sigma, США) в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали PBS. Просматривали и фотографировали препараты с помощью инвертированного флюоресцентного микроскопа Olympus CKX41 (OLYMPUS, США). Для окрашивания исследуемых культур клеток использовали поликлональные кроличьи антитела против hTERT (Abcam, США), Anti-rabbitAlexa 546 (Invitrogen, США).

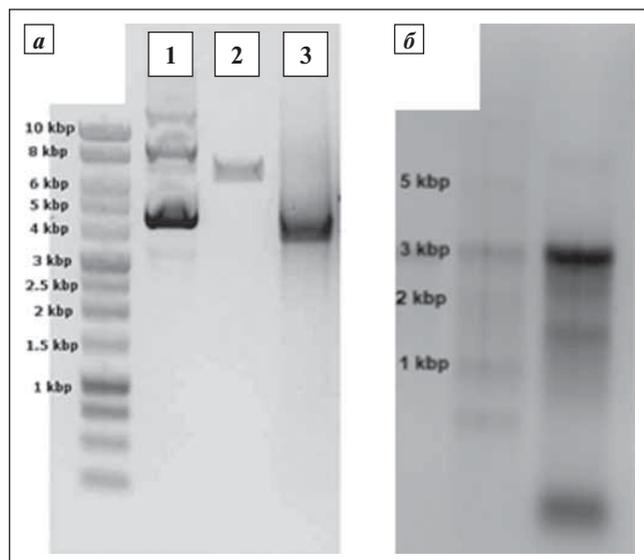
#### **Измерение теломеразной активности методом TRAP**

Анализ теломеразной активности проводили при помощи набора для измерения теломеразной активности TRAPEZE® XL Telomerase Detection Kit (Millipore, США) по протоколу, предложенному производителем. Результаты оценивали с помощью стандартного электрофореза в полиакриламидном геле и системы гель-документации BIO-RAD™XR (BIO-RAD, США).

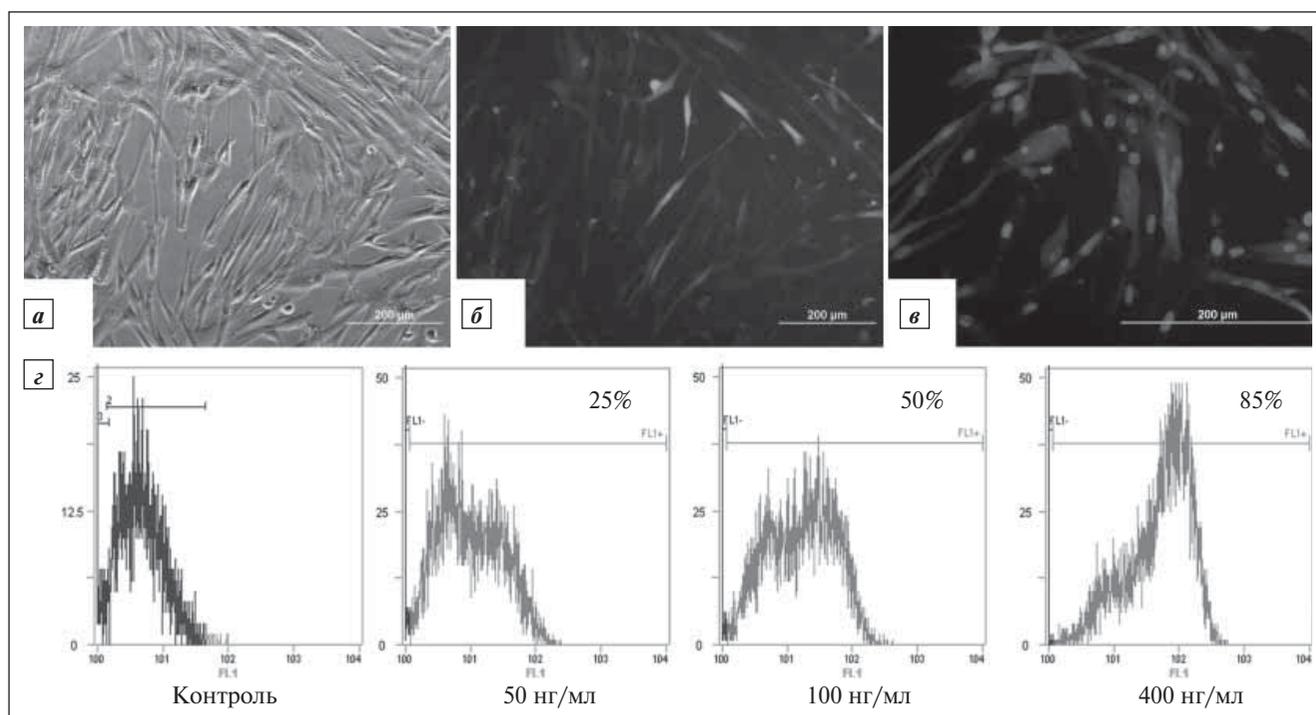
#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

Биоптаты кожи взрослого человека были получены от соматически здорового донора. Была выделена культура фибробластов кожи человека, получившая обозначение hFb1. После выделения клетки были протестированы на отсутствие микробиологической и вирусной контаминации (ООО «ЛИТЕХ», Россия). При выделении культуры возникло множество обособленных центров роста клеток, фенотипически не отличающихся друг от друга. Колонии были смешаны и культивировались как одна культура клеток, без клонирования. Полученная культура постнатальных фибробластов кожи человека после 2 пересевов имела гомогенный характер, клетки – с ярко выраженной фибробластоподобной морфологией, хорошо прикреплялись и распластывались по пластиковой подложке культуральных флаконов.

Молекулярный синтез плазмид, содержащих последовательности генов *hTERT* и *EGFP* (использовался нами в качестве маркерного гена) с фланкирующими некодирующими участками UTR1 и UTR2, был произведен в ООО «Евроген» (Москва, Россия). С помощью ПЦР с «длинным» праймером мы амплифицировали матрицы генов с добавлением политимидинового участка в 80 нуклеотидов. Далее нами были синтезированы зрелые мРНК генов *hTERT* и *EGFP* (рис. 1), содержащие Кэп-аналог на 5'-конце, некодирующие последовательности UTR1



**Рис. 1.** Электрофореграммы результатов синтеза мРНК генов *hTERT*. а – подготовка матрицы для синтеза мРНК (1 – плаزمид; 2 – линеаризованная плазмид; 3 – результаты ПЦР-амплификации матрицы); б – РНК гель-электрофорез, дорожка справа – мРНК *hTERT*



**Рис. 2.** Анализ экспрессии гена *EGFP* после введения мРНК гена *hTERT*. а – культура фибробластов кожи человека *hFb1*, фазовый контраст, размер шкалы – 200 мкм; б – свечение зеленого флуоресцентного белка *EGFP* в клетках *hFb1* после трансфекции мРНК *EGFP*, размер шкалы – 200 мкм; в – окраска антителами против *EGFP* клеток *hFb1* после трансфекции мРНК *EGFP* (красный – *EGFP*, синий – окраска ядер *DAPI*), размер шкалы – 200 мкм; г – увеличение доли клеток экспрессирующих *EGFP* в зависимости от концентрации вводимой мРНК *EGFP*

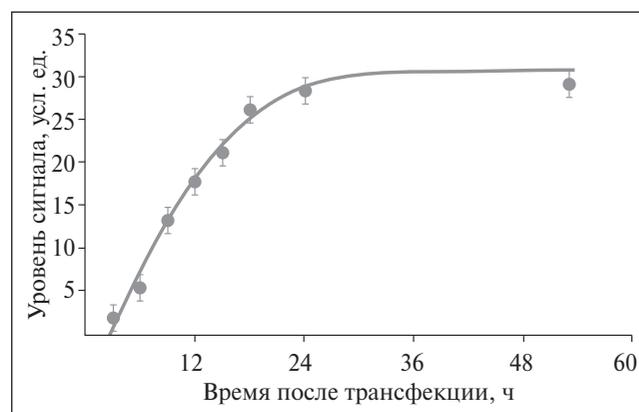
и UTR2, полиадениновый участок, а также с модифицированными нуклеотидами 5-метилцитидин и псевдоуридин вместо цитидина и уридина соответственно. В ходе каждого синтеза выход мРНК составлял 20–30 мкг.

На 1-м этапе работы мы отработали методы введения мРНК в фибробласты *hFb1* с использованием гена зеленого флуоресцентного белка *EGFP*. мРНК вводили в клетки с помощью липофектамина, результаты оценивали по свечению зеленого белка внутри клеток при помощи флуоресцентной микроскопии (рис. 2), количественную оценку проводили с применением проточной цитофлуориметрии. Мы наблюдали дозозависимый характер трансляции введенной мРНК – при введении 50; 200 и 400 нг/мл мРНК *EGFP* через 1 сут доля клеток с зеленым сигналом составляла соответственно 25; 50 и 85% (см. рис. 2).

Чтобы оценить время жизни введенной мРНК, мы после введения одинаковой дозы мРНК *EGFP* (500 нг/мл), измеряли усредненный уровень флуоресцентного сигнала в клетках в течение 52 ч. С учетом полученных данных построен график увеличения сигнала от времени (рис. 3), который носил характер кривой, выходящей на плато. Учитывая, что *EGFP* является стабильным ксеногенным белком, медленно распадающимся в клетках человека, мы можем считать, что момент выхода кривой на плато совпада-

ет с моментом распада последних введенных молекул мРНК, когда прекращается синтез белка. Таким образом, время жизни введенной мРНК составило 24 ч после введения.

Далее мы ввели мРНК *hTERT* в клетки культур *hFb1* в концентрации 500 нг/мл. Через 1 сут после введения клетки зафиксировали и при помощи методов иммуноцитохимии попытались определить,



**Рис. 3.** Накопление флуоресцентного сигнала *EGFP* в клетках *hFb1* в зависимости от времени после трансфекции мРНК *EGFP*. По оси абсцисс – время, ч, по оси ординат – усредненный флуоресцентный сигнал от одной клетки, усл. ед.

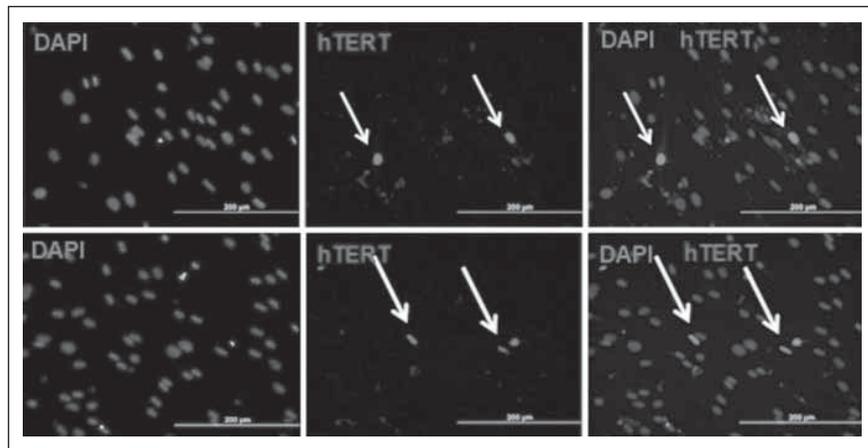
проходит ли трансляция вводимой мРНК. После окраски антителами наблюдалось специфическое окрашивание в небольшой доле клеток (1–5%) в каждом случае (рис. 4). Локализация сигнала внутри ядер клеток может свидетельствовать о том, что фолдинг белка hTERT прошел правильно, и продукт трансляции выполняет свои функции. С целью подтверждения специфической функциональной активности продукта введенной мРНК hTERT мы попытались измерить теломеразную активность внутри клеток при помощи метода TRAP, через 1 сут после введения. Нам удалось проследить по-

явление теломеразной активности в исследуемых клетках по сравнению с отрицательным (интактная культура) и положительным контролем 1608-hT (рис. 5).

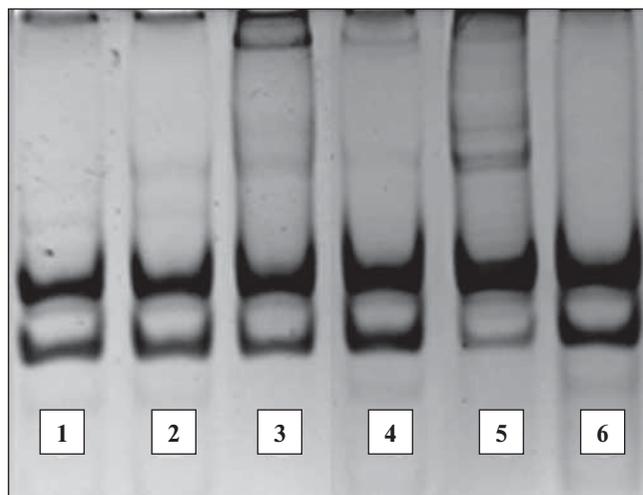
Одним из интересных аспектов данного исследования был вопрос: возможна ли реактивация эндогенной экспрессии теломеразы при кратковременной экзогенной экспрессии? Подобные системы с положительной обратной связью экспрессии, когда транскрипционный фактор напрямую или опосредованно активирует экспрессию своего гена, существуют в природе и описаны в литературе [3, 7].

Для проверки предположения о реактивации эндогенной теломеразы мы поставили следующий эксперимент. Клетки культуры hFb1 трансфицировали мРНК hTERT 3 сут подряд, после чего культивировали в течение 7 сут, чтобы исключить вероятность наличия введенной мРНК и ее продуктов трансляции. На 8-е сутки клетки снимали и анализировали методом TRAP на наличие теломеразной активности. Ни одного случая наличия теломеразной активности в исследуемых культурах нами не отмечено (рис. 6).

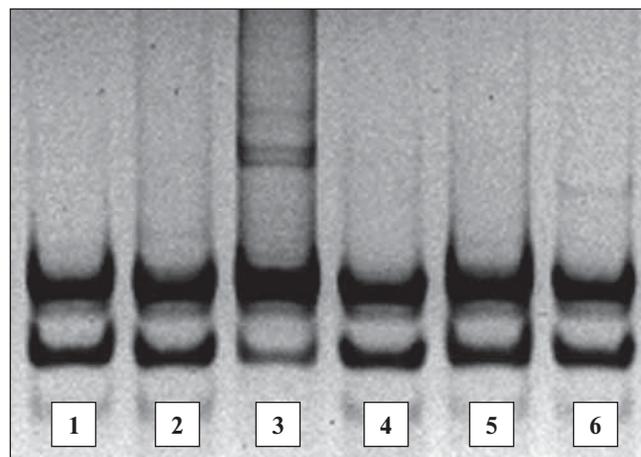
Таким образом, нами получены данные о том, что синтезируются



**Рис. 4.** Иммуноцитохимический анализ культуры hFb-1 после трансфекции мРНК hTERT. Специфический сигнал отмечен стрелками



**Рис. 5.** Электрофореграмма продуктов реакции TRAP с различными экстрактами клеток: 1 – экстракт клеток hFb-1; 2 – термоинактивированный экстракт клеток hFb-1 (негативный экстракт); 3 – экстракт клеток hFb-1 через 1 сут после трансфекции мРНК hTERT; 4 – термоинактивированный экстракт hFb-1 с мРНК hTERT (отрицательный контроль); 5 – экстракт клеток 1608-hT (положительный контроль); 6 – термоинактивированный экстракт 1608-hT (отрицательный контроль)



**Рис. 6.** Электрофореграмма продуктов реакции TRAP с экстрактами клеток hFb-1 до и после введения мРНК гена hTERT. 1 – экстракт клеток hFb-1; 2 – термоинактивированный экстракт клеток hFb-1 (отрицательный контроль); 3 – экстракт клеток hFb-1 через 1 сут после трансфекции мРНК hTERT; 4 – термоинактивированный экстракт hFb-1 с мРНК hTERT (отрицательный контроль); 5 – экстракт клеток hFb-1 через 7 дней после трансфекций мРНК hTERT; 6 – термоинактивированный экстракт клеток hFb-1 через 7 дней после трансфекций мРНК hTERT (отрицательный контроль)

ванная *in vitro* модифицированная мРНК гена *hTERT* способна вызывать теломеразную активность в клетках культуры фибробластов кожи человека. Усредненная эффективность трансфекции и трансляции *hTERT* по результатам нескольких независимых экспериментов, составила не более 5%, что существенно ниже эффективности трансфекции-трансляции EGFP, которая в аналогичных условиях составляла 80–90%. К возможным причинам такого эффекта следует отнести большую массу мРНК *hTERT* по сравнению с мРНК EGFP (длина 3,5 т.п.н. и 1 т.п.н. соответственно), а также более сложную 3-мерную структуру из-за наличия богатых-G-C участков в составе мРНК *hTERT*, что усложняет ее синтез и трансляцию. Тем не менее даже относительно небольшой доли клеток, экспрессирующих теломеразу, было достаточно, чтобы отследить теломеразную активность культуры методом TRAP. Предполагаем, что в клетках с индуцированной теломеразой укороченные теломерные участки хромосом приходят в первоначальное состояние, изменяя при этом свою 3-мерную структуру [16, 19], а также эпигенетический профиль субтеломерных областей, что в конечном итоге должно «омолаживать» клетки, позволяя им существенно увеличить свой пролиферативный потенциал.

Данная методика в перспективе может быть использована в клинической практике, поскольку пациентами для клеточно-замещающих технологий

часто становятся люди пожилого возраста, аутологичные клетки которых обладают пониженным пролиферативным потенциалом и, соответственно, низкой способностью к масштабному наращиванию. Индуцируя кратковременную теломеразную активность введением модифицированной мРНК *hTERT*, не используя методы генетического модифицирования, можно было бы получать культуры «омоложенных» хорошо пролиферирующих клеток, обладающих полной иммунной совместимостью с пациентом.

## ВЫВОДЫ

1. Введение модифицированной мРНК гена *hTERT*, синтезированной *in vitro*, индуцирует теломеразную активность в фибробластах кожи человека.

2. Индуцирование теломеразной активности при помощи мРНК *hTERT* носит кратковременный характер, что может свидетельствовать об отсутствии «авторегуляторной петли» (положительной обратной связи экспрессии) у гена каталитического компонента теломеразы.

*Работа выполнена при поддержке  
ФЦНТП «Исследования и разработки  
по приоритетным направлениям  
развития науки и техники на 2007-2012 гг.»  
(Государственный контракт № 16.512.11.2106,  
шифр 2011–1.2-512-050-068).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Дашинамаев Э.Б., Мучкаева И.А., Файзуллин Р.Р., Егоров Е.Е., Акимов С.С., Терских В.В., Васильев А.В., Кирпичников М.П. Индукция теломеразной активности увеличивает эффективность репрограммирования фибробластов кожи человека // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2012; 1: 8–14.
2. Bernardes de Jesus B., Vera E., Schneberger K. et al. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer // EMBO Mol Med. – 2012; 8: 691–704.
3. Boyer L., Lee T., Cole M. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells // Cell. – 2005; 122: 947–56.
4. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. – 2009; 85: 348–62.
5. Jia F., Wilson K., Sun N. et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells // Nat. Methods. – 2010; 7: 197–9.
6. Kim D., Kim C., Moon J. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins // Cell Stem Cell. – 2009; 4: 472–6.
7. Loh Y., Wu Q., Chew J. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells // Nat. Genet. – 2006; 38: 431–40.
8. Mathew R., Jia W., Sharma A. et al. Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency // FASEB J. – 2010; 24: 2702–15.
9. Miyatsuka T., Kaneto H., Kajimoto Y. et al. Ectopically expressed PDX-1 in liver initiates endocrine and exocrine pancreas differentiation but causes dysmorphogenesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003; 310 (3): 1017–25.
10. Sekiya S., Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors // Nature. – 2011; 475 (7356): 390–3.
11. Szabo E., Rampalli S., Risueño R. et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors // Nature. – 2010; 468 (7323): 521–6.
12. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. – 2007; 131 (5): 861–72.
13. Utikal J., Polo J., Stadtfeld M. et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells // Nature. – 2009; 460: 1145–8.
14. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // Nature. – 2010; 463: 1035–41.
15. Warren L., Manos P., Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA // Cell Stem Cell. – 2010; 7: 618–30.
16. Wright W., Shay J. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence // Trends. Genet. – 1992; 8 (6): 193–7.
17. Yakubov E., Rechavi G., Rozenblatt S. et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2010; 394: 189–93.
18. Yehezkel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y. et al. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives // Epigenetics. – 2011; 6: 63–75.
19. Zvereva M., Shcherbakova D., Dontsova O. Telomerase: structure, functions, and activity regulation // Biochemistry. – 2010; 75 (13): 1563–83.