

ГЕНЕТИКА

УДК 57.085.23

ИНДУКЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНОЙ АКТИВНОСТИ УВЕЛИЧИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**Э.Б. Дашинимаев¹, И.А. Мучкаева¹, Р.Р. Файзуллин¹, Е.Е. Егоров²,
С.С. Акимов³, В.В. Терских¹, А.В. Васильев¹, М.П. Кирпичников***(кафедра биоинженерии; e-mail: dashinimaev@gmail.com)*

Технологии репрограммирования клеток человека являются перспективным направлением развития клеточной биологии с дальней перспективой использования данных методов для клеточно-замещающей терапии в клинической практике. Одной из проблем, встающих на пути исследователей, является низкая эффективность репрограммирования и использование нежелательных онкогенов в первоначальных методиках. В данной работе нами был предложен альтернативный модифицированный метод репрограммирования фибробластов кожи человека. Было показано, что индукция теломеразной активности увеличивает выход репрограммированных клеток и позволяет исключить онкоген с-Мус из используемого набора генов.

Ключевые слова: теломераза, репрограммирование, фибробласты кожи человека.

Одним из самых перспективных и развивающихся направлений в современной клеточной биологии является репрограммирование соматических клеток человека. При помощи методик репрограммирования исследователи надеются получать пациент-специфические клетки различных типов тканей, которые можно было бы использовать в заместительной клеточно-тканевой терапии. Помимо разработанных методов получения пациент-специфических плюрипотентных стволовых клеток посредством переноса ядер в ооциты (somatic cell nuclear transfer, SCNT) [1, 2], а также при помощи слияния соматических клеток с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) [3] в 2006—2007 гг. был разработан новый подход к репрограммированию клеток человека: при помощи лентивирусных трансфекций ключевых генов плюрипотентности Oct4, Sox2, KLF4, с-Мус (KMOS) удалось получить репрограммированные клетки, названные позднее индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПС клетки) [4, 5]. ИПС клетки походили на ЭСК по многим характеристикам, включая профили генной экспрессии, морфологию, характер метилирования ДНК, способность давать начало всем трем зародышевым листкам *in vitro* и формирование зрелых тератом в иммунодефицитных мышах.

Одной из проблем подобного метода является низкая эффективность репрограммирования. В ранней

исходной методике трансфекцией четырьмя факторами KMOS репрограммированию подвергались только порядка 0,01—0,1% трансфицированных клеток. Другой явной проблемой подобного метода репрограммирования является использование онкогена с-Мус в составе набора репрограммирования KMOS. Экзогенная сверхэкспрессия этого гена может вызывать активацию генов онкосупрессоров, например Cdkn1a, Cdkn2a, p53, которые вовлечены в различные пути дифференцировки и подавления пролиферации. Также использование этого онкогена негативно влияет на возможность применения метода в клинике, поскольку не исключена вероятность реактивации встроенного гена с последующей злокачественной трансформацией репрограммированных клеток [6]. Показательно, что у химерных мышей, полученных из ИПС клеток без введения с-Мус, не образовывалось опухоли после рождения, тогда как приблизительно 15% животных, полученных от ИПС клеток с экзогеном с-Мус, страдали онкологическими заболеваниями [7].

В то же время известно, что во время репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния происходит реактивация теломеразной активности с последующим достраиванием теломерных участков хромосом и регулированием эпигенетического профиля субтеломерных областей генома [5, 8]. Ряд исследователей напрямую связывают ре-

¹ Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова. Россия, 119334, Москва, ул. Вавилова.

² Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта. Россия, 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

³ Department of Anatomy and Cell Biology, The George Washington University Medical Center, USA.

активацию теломеразы и приобретение иммортализованного статуса с эффективностью репрограммирования соматических клеток человека [9–11]. Также известно, что индукция теломеразной активности стимулирует пролиферацию клеток, что является дополнительным положительным фактором для репрограммирования.

Цель данной работы — разработка модифицированной технологии репрограммирования соматических клеток человека (на примере фибробластов кожи взрослого человека), основанной на предварительной индукции теломеразной активности в репрограммируемых клетках с последующим введением генов плюрипотентности. Данный подход, по нашему мнению, позволит исключить использование онкогена *c-Myc* в репрограммирующем наборе генов и, возможно, повысит эффективность репрограммирования.

Материалы и методы

Выделение и культивирование постнатальных фибробластов кожи человека (ПФЧ)

Фибробласты выделялись из биопсии кожи взрослого человека с помощью механической дезагрегации и ферментативной обработки 0,1%-й коллагеназой I типа (Worthington, США) с последующей отмывкой и центрифугированием. Клетки культивировали в среде DMEM (Панэко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (Hyclone, США) в стандартных культуральных условиях (5% CO₂, +37°). Пересев клеточных культур производили по стандартной методике с использованием растворов Версена (Панэко, Россия) и Трипсин-ЭДТА (РАА, Австрия).

Иммуноцитохимическое окрашивание

Клетки высаживали на пластиковую поверхность в 4-луночных или 24-луночных планшетах (Costar, США) в полной ростовой среде. Клетки фиксировали 4%-м формальдегидом на PBS (Панэко, Россия) 30 мин при комнатной температуре, дважды промывали PBS. Перед окрашиванием антителами клетки 1 ч обрабатывали блокирующим раствором (БР) (PBS + 10% ЭТС + 0,1% Triton X-100). Первые антитела наносили в разведении 1/50–1/100 в БР, инкубировали 2 ч при +37°. Далее клетки отмывали 3 раза PBS и наносили вторые антитела в разведении 1/500 в БР. Инкубировали 1 ч при +37°, затем отмывали 3 раза PBS. Затем препараты с клетками окрашивали раствором DAPI (1,5 мкг/мл на PBS, Sigma, США) 15 мин, промывали PBS и заключали в 100%-й глицерин. Просматривали и фотографировали препараты с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus CKX41 (OLYMPUS, США). Для ИЦХ характеристики исследуемых культур клеток использовали моноклональные

мышинные и поликлональные кроличьи антитела против Oct4 (Chemicon, США), Sox2 (Invitrogen, США), Nanog (Abcam, США), Anti-mouse Alexa 546 (Invitrogen, США), Anti-rabbit Alexa 546 (Invitrogen, США).

Определение экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Для выделения тотальной РНК из клеток использовали набор Invisorb®Spin Cell RNA Mini Kit (Invitrogen, Германия) по протоколу, предложенному производителем. Измерение концентрации полученной тотальной РНК и нормирование производили при помощи кюветного спектрофотометра BioPhotometer (Eppendorf, Германия). Обратную транскрипцию мРНК осуществляли при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК Олиго(dT)15 (ЗАО “Силекс”, Россия) по протоколу, предложенному производителем. Полученный раствор кДНК разводили по аликвотам и хранили при –70°. Для проведения ПЦР исследуемых генов использовали набор готовой смеси для ПЦР ScreenMix-HS (ЗАО “Евроген”, Россия). Экспрессию генов анализировали при помощи гель-электрофореза в 1%-м агарозном геле и системы гель-документации BIO-RAD™XR (BIO-RAD, США). Для анализа экспрессии генов в исследуемых культурах клеток использовали праймеры, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров для ОТ-ПЦР, использованных в работе

Ген	(последовательность) 5' —> 3'	Длина фраг- мента, н.п.	Темпе- ратура плавления, °C
<i>hOct4</i>	CTTGAATCCCGAATGGAAAGGG CCTTCCCAATAGAACCCCA	206	61 61,2
<i>hSox2</i>	TGGACAGTTACGCGCACAT CGAGTAGGACATGCTGTAGGT	215	61,9 60,7
<i>hNanog</i>	GCGTCATAAGGGGTGAGTTT AGAACATTCAAGGGAGCTTGC	60	60,4 61,5
<i>hREX1</i>	GCGTCATAAGGGGTGAGTTT AGAACATTCAAGGGAGCTTGC	134	60,3 60,6
<i>hNestin</i>	GAAACAGCCATAGAGGGCAAA TGGTTTTCCAGAGTCTTCAGTGA	167	60,3 61,1
<i>hGFAP</i>	CCTCTCCCTGGCTCGAATG GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA	161	61,5 61,8
<i>hGAPDH</i>	TGTTGCCATCAATGACCCCTT CTCCACGACGTAAGTCAAGC	202	62 62,1

Лентивирусные конструкции

Ген каталитического компонента теломеразы человека hTERT был клонирован в вектор SIN-MU3-IR-G-SW под промотером Pmscv с ампициллиновой бактериальной устойчивостью. Ген hTERT в данной конструкции сопряжен с репортерным геном зелено-

го флуоресцентного белка EGFP через участок IRES, что позволяет получать экспрессию обоих белков с одного промотора. Молекулярный синтез плазмид лентивирусных конструкций с генами Oct4, Sox2, Nanog был заказан в ЗАО “Евроген” (Россия). Гены Oct4, Sox2 и Nanog были клонированы в стандартный вектор pLVT, поставляемый данной фирмой, под EF1-short промотором, с ампициллиновой бактериальной устойчивостью.

Наращивание и выделение плазмид векторов проводили при помощи компетентных клеток E-Coli (ЗАО “Евроген”, Россия) и набора для выделения и очистки плазмидной ДНК QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколам, предложенным производителями. Упаковку лентивирусных конструкций производили в клетках линии 293T при помощи набора для трансфекции плазмидной ДНК Lipofectamin 2000 (Invitrogen, США) и набора для упаковки лентивирусных вирусных частиц третьего поколения ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, США) по протоколам, предложенным производителями. Полученные вирусные стоки разделяли по аликвотам и хранили замороженными при -80° .

Трансфекция клеток при помощи лентивирусных конструкций

За сутки до трансфекции клетки рассеивали в лунки 6-луночного планшета, 10^4 клеток на лунку. На следующий день после удаления ростовой среды клетки промывали средой DMEM без сыворотки и добавляли вирусный концентрат, разведенный полной ростовой средой в соотношении 1:1, с добавлением полибрена (Sigma, США) в конечной концентрации 5 мкг/мл. Далее клетки инкубировали в течение ночи, после чего на следующий день культуральную среду, содержащую вирус, меняли на полную ростовую среду. Эффективность лентивирусной трансфекции оценивали по параллельному эксперименту с трансфекцией лентивирусной конструкции, кодирующей ген EGFP, проведенной с такими же параметрами (соотношение количества копий вируса на 1 клетку). Через 3 сут на флуоресцентном микроскопе подсчитывали процент трансфицированных клеток. При условии соотношения 5–10 копий вируса на 1 клетку эффективность трансфекции составляет порядка 95%.

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

Биопсии кожи взрослого человека были получены от 2 соматически здоровых доноров разного возраста. Были выделены 2 культуры фибробластов кожи человека, получившие обозначения ПФЧ1 и ПФЧ2 соответственно. После выделения клетки были протестированы на отсутствие микробиологической и вирусной контаминации (ООО “Литех”, Россия). При выделении каждой культуры возникало множество обособленных центров роста клеток, фенотипически не отличающихся друг от друга. Колонии были смешаны и культивировались как одна первичная культура клеток, без какого-либо клонирования. Полученные культуры постнатальных фибробластов кожи человека после 2 пересевов имели гомогенный характер, клетки имели ярко выраженную фибробластоподобную морфологию, хорошо прикреплялись и распластывались по пластиковой подложке культуральных флаконов (рис. 1).

Клетки культур ПФЧ1 и ПФЧ2 были протрансфицированы при помощи лентивирусной конструкции SIN-hTERT-EGFP, полученные теломеризованные культуры были обозначены ПФЧ1-hTERT и ПФЧ2-hTERT соответственно. Эффективность транс-

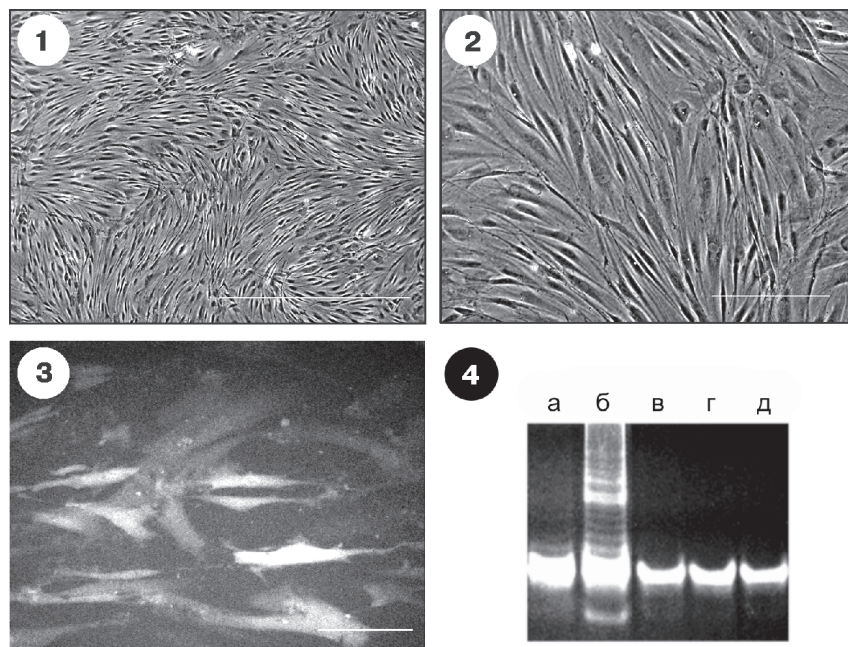


Рис. 1. Культуры постнатальных фибробластов кожи человека: 1, 2 — культура ПФЧ1, фазовый контраст, величина шкалы 1 — 500 мкм; 2 — 150 мкм; 3 — флуоресценция EGFP в теломеризованной культуре ПФЧ1-hTERT, величина шкалы — 75 мкм; 4 — результаты теста на теломеразную активность культуры ПФЧ1-hTERT; а — положительный контроль, клеточный экстракт HeLa, б — экстракт клеток ПФЧ1-hTERT, в — негативный контроль-1, г — экстракт клеток ПФЧ1, д — негативный контроль-2

фекции определяли по свечению репортерного гена EGFP, в обоих случаях эффективность составила порядка 75% (рис. 1). Сортировку или клонирование полученных культур не производили. Трансфицированные клетки морфологически не отличались от контрольных, скорость пролиферации не изменилась.

Наличие продукта гена hTERT в трансфицированных клетках анализировали при помощи метода измерения теломеразной активности TRAP. В качестве положительного контроля использовался экстракт теломеразопозитивных опухолевых клеток HeLa. В качестве негативного контроля использовали термо-инактивированные экстракты исследуемых клеток (10 мин при +80°) (рис. 1). В результате проведения теста сильный и различимый сигнал продукта TRAP-реакции был обнаружен только в реакциях с экстрактом теломеризованных культур и в положительном контроле. Во всех остальных случаях, в том числе и с экстрактом контрольных культур клеток, продуктов реакции удлинения теломерных повторов не наблюдалось.

Для репрограммирования клеточных культур была применена стратегия одновременной трансфекции всех трех факторов репрограммирования Oct4, Sox2, Nanog. Трансфекцию производили как в интактные культуры клеток, так и в культуры фибробластов с индуцированной теломеразной активностью. Полученные культуры были обозначены ПФЧ1-OSN, ПФЧ2-OSN и ПФЧ1-hT-OSN, ПФЧ2-hT-OSN соответственно. Далее полученные трансфицированные культуры культивировались на стандартной полной ростовой среде для фибробластов со сменой среды каждые 2 сут. Сортировку или клонирование полученных культур не производили.

Через 6 дней после трансфекции были замечены первые изменения в трансфицированных культурах — появление центров роста колоний клеток, отличных по морфологии от фибробластов (морфология эпителиального типа) (рис. 2). Помимо морфологии данные репрограммированные клетки отличались также усиленной пролиферацией и отсутствием свойства контактного торможения, в центрах подобных колоний клетки начинали образовывать трехмерные структуры. Мы наблюдали значительные различия в выходе репрограммированных клеток между культурами ПФЧ1-OSN, ПФЧ2-OSN и ПФЧ1-hT-OSN, ПФЧ2-hT-OSN. В лунках с интактными клетками насчитывалось порядка 3—5 центров роста, в то время как в варианте с теломеризованными культурами — порядка 17—25 (табл. 2). Кроме этого, колонии репрограммированных теломеризованных клеток отличались от по-

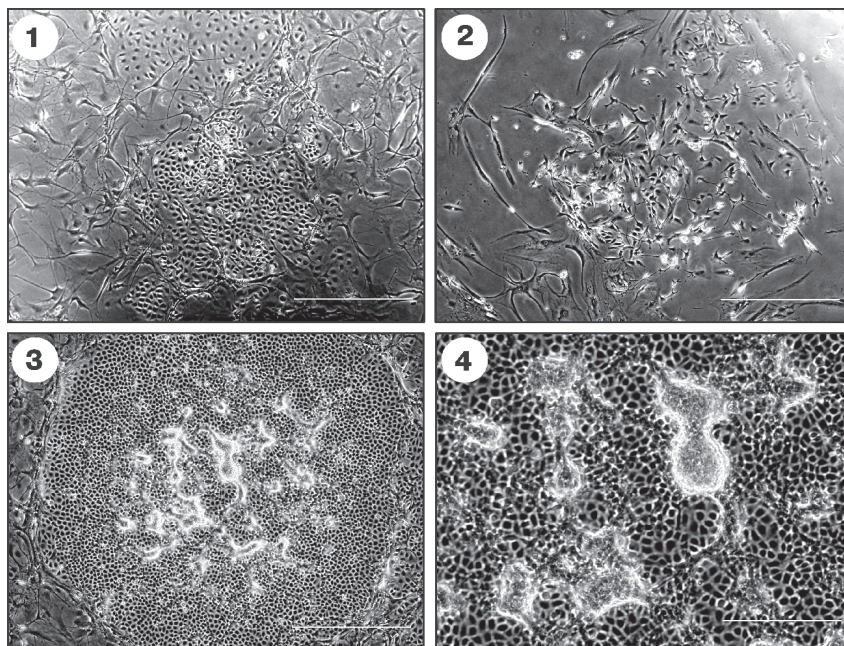


Рис. 2. Колонии репрограммированных клеток в культурах клеток ПФЧ1-OSN и ПФЧ1-hT-OSN: 1 — образование колонии в культуре ПФЧ1-hT-OSN; 2 — образование колонии в культуре ПФЧ1-OSN; 3, 4 — развитие колоний репрограммированных клеток в культуре ПФЧ1-hT-OSN. Фазовый контраст, величина шкалы: 1, 2, 3 — 375 мкм, 4 — 75 мкм

добных интактных гораздо большими темпами пролиферации и склонностью к образованию сомкнутого моно слоя (рис. 2).

На 10-е сут культивирования после начала эксперимента в лунках образовался плотный моно слой, содержащий как исходные клетки с фибробластоподобной морфологией, так и репрограммированные клетки. Клетки из одной лунки пересекали на две чашки Петри Ø10 см фидерным слоем из инактивированных MEF в среде для фибробластов. На следующий день, после прикрепления и распластывания клеток, среду для фибробластов заменили на среду для поддержания роста ЭСК человека mTeSR1 (Stem Cell Technologies, США). В течение следующих 14 сут культивирования среду в чашках меняли раз в 3—4 сут. За время культивирования в теломеризованных культурах ПФЧ1-hT-OSN,

Таблица 2

Выход клонов репрограммированных клеток в вариантах с интактными и теломеризованными клетками

№	Название культуры	Количество клонов репрограммированных клеток в лунке 6-луночного планшета	Эффективность репрограммирования, %
1	ПФЧ1-OSN	$\approx 5 \pm 1$	$\approx 0,05$
2	ПФЧ2-OSN	$\approx 3 \pm 1$	$\approx 0,03$
3	ПФЧ1-hT-OSN	$\approx 25 \pm 3$	$\approx 0,25$
4	ПФЧ2-hT-OSN	$\approx 17 \pm 3$	$\approx 0,17$

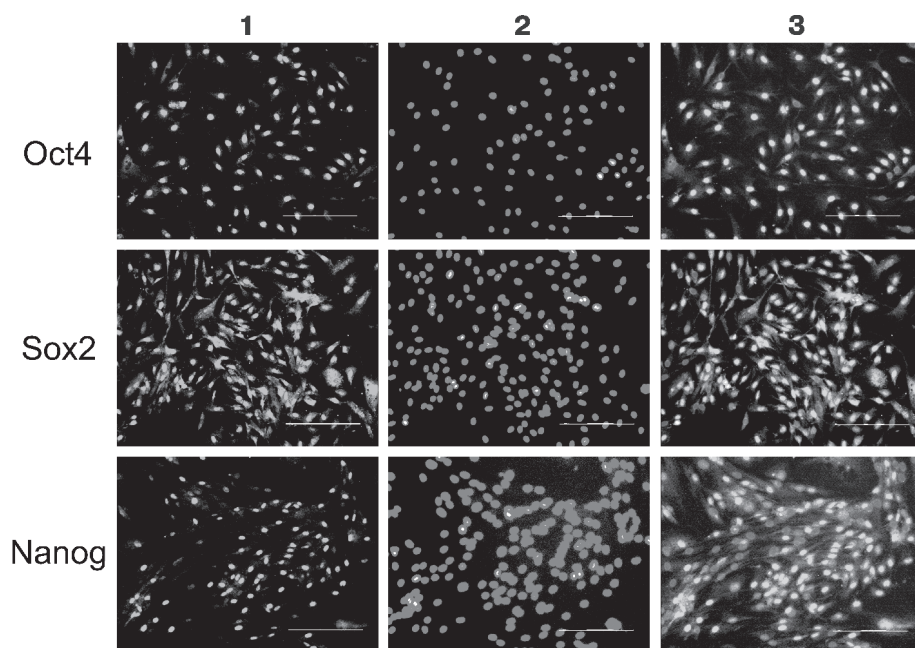


Рис. 3. Иммуноцитохимическая окраска антителами на Oct4, Sox2, Nanog культуры ПФЧ1-hT-OSN: 1 — окраска антителами; 2 — окраска ядер клеток DAPI; 3 — совмещение, величина шкалы: 1, 2, 3 — 375 мкм

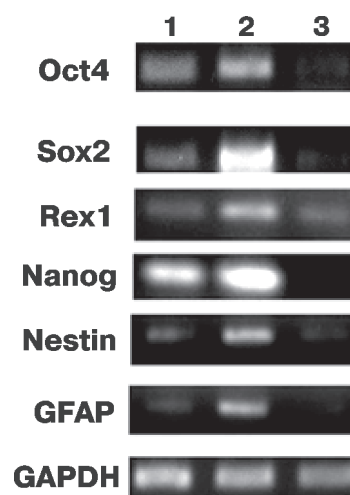


Рис. 4. ОТ-ПЦР анализ экспрессии генов Oct4, Sox2, Rex1, Nanog, Nestin, GFAP в репрограммированных клетках культуры ПФЧ1-hT-OSN: 1 — положительный контроль, культура ЭСК человека; 2 — культура клеток ПФЧ1-hT-OSN; 3 — негативный контроль, культура клеток ПФЧ1-hTERT

ПФЧ2-hT-OSN наблюдали рост колоний репрограммированных клеток, отличающихся друг от друга по морфологии и скорости роста. Часть из них имела морфологию клеток, характерную для ЭСК и iPS клеток (рис. 2) — плотный монослой эпителиоподобных, небольших по размеру клеток с образованием трехмерных структур в центре роста колонии. В культурах с интактными клетками ПФЧ1-OSN и ПФЧ2-OSN роста подобных колоний не наблюдали.

После 24 сут с момента начала эксперимента клоны, представляющие наибольший интерес для исследования, выделяли из чашки механическим способом. Клоны переводили в суспензию при помощи раствора трипсин-ЭДТА и переносили в лунки 24-луночного планшета, покрытые матригелем (BD Biosciences, США) для дальнейших анализов. Иммуноцитохимическое окрашивание репрограммированных клеток показало наличие экспрессии введенных генов Oct4, Sox2 и Nanog (рис. 3). Экспрессия генов в репрограммированных клетках культуры ПФЧ1-hT-OSN изучалась нами также при помощи метода ОТ-ПЦР (рис. 4). В ходе исследования мы проверили экспрессию генов Oct4, Sox2, Rex1, Nanog, а также генов маркеров нейральной дифференцировки Nestin и GFAP. В качестве положительного контроля метода брали мРНК, выделенную из культуры ЭСК человека, в качестве негативного контроля — мРНК, выделенную из культуры нерепrogramмированных теломеризованных клеток ПФЧ1-hTERT. Было установлено, что гены Oct4, Sox2, Nanog, Nestin, GFAP экспрессируются в репрограммированных клетках на уровне, сравнимом с положительным контролем. Удивительным оказался факт наличия экспрессии гена Rex1 во всех трех сравниваемых

культурах клеток, включая теломеризованные клетки ПФЧ1-hTERT.

Таким образом, нами были получены данные о том, что индукция теломеразной активности не только не ингибирует репрограммирование фибробластов кожи человека при помощи трансфекции генов плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog, но даже может способствовать этому процессу. Использование клеток с активной теломеразой позволило исключить онкоген c-Мус из набора генов репрограммирования. Эффективность репрограммирования интактных клеток ПФЧ1 и ПФЧ2 в наших условиях была довольно низка и составила приблизительно 0,03—0,05%, что коррелирует с данными из литературных источников, утверждающими, что фибробласты, выделенные из кожи взрослого человека, обладают сравнительно низкой способностью к генерации ИПС клеток по сравнению с эмбриональными и неонатальными фибробластами [12, 13]. В то же время эффективность репрограммирования теломеризованных клеток ПФЧ1-hT-OSN, ПФЧ2-hT-OSN составила приблизительно 0,17—0,25%, что является относительно высоким результатом. Существует несколько точек зрения, каким образом теломеразная активность может положительно влиять на репрограммирование. Известно, что соматические клетки с введенным геном hTERT обладают повышенной устойчивостью к стрессу [14—16], что может повышать их выживаемость в условиях цитотоксического эффекта лентивирусной трансфекции. Действительно, нами был отмечен гораздо меньший процент апоптотирующих клеток во время трансфекции генами OSN в культурах с теломеризованными клетками (данные не представлены). Так, немаловажным

является тот факт, что теломеризованные клетки обладают повышенной пролиферативной способностью и соответственно повышенным уровнем эндогенных генов пролиферации (например, того же семейства Мус), что, как известно, является критически важным элементом процесса репрограммирования. Последним и самым любопытным для изучения может стать факт, что в клетках с индуцированной теломеразой укороченные теломерные участки хромосом приходят в свое первоначальное состояние, изменяя при этом свою трехмерную структуру [17–19]. Помимо этого теломеразная активность изменяет также и состояние субтеломерных областей, влияя на уровень метилирования генов, расположенных в этих областях. Клетки, полученные таким образом, переходят в свое “ювенильное” состояние, что, как мы показали, увеличивает эффективность репрограммирования. Данная методика в перспективе может быть использована в клинической практике, поскольку пациентами для клеточно-замещающих технологий зачастую становятся люди в пожилом возрасте, аутологичные клетки которых обладают пониженным пролиферативным потенциалом и соответственно низкой способностью к репрограммированию. Индуцируя теломеразную активность в этих клетках, можно было бы получать адекватный ма-

териал для репрограммирования и получения специализированных клеток для клеточно-замещающих технологий.

Выводы

1. Индукция теломеразной активности в фибробластах кожи взрослого человека увеличивает эффективность репрограммирования при помощи лентивирусных трансфекций генов плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog.

2. Использование теломеризованных клеток в качестве клеток-мишеней для репрограммирования позволяет исключить онкоген с-Мус из набора генов для репрограммирования.

Авторы выражают благодарность Dr. Robert Hawley (George Washington University, USA) за любезно предоставленную констукцию SIN-MU3-IR-G-hTERT.

* * *

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // *Nature*. 1996. Vol. 380. P. 64–66.
2. Byrne J.A., Pedersen D.A., Clepper L.L., Nelson M., Sanger W.G., Gokhale S., Wolf D.P., Mitalipov S.M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer // *Nature*. 2007. Vol. 450(7169). P. 497–502.
3. Tada M., Takahama Y., Abe K., Nakatsuji N., Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells // *Curr. Biol*. 2001. Vol. 11. P. 1553–1558.
4. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126(4). P. 663–676.
5. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell*. 2007. Vol. 131(5). P. 861–872.
6. Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // *Science*. 2008. Vol. 322(5903). P. 949–953.
7. Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochizuki Y., Takizawa N., Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts // *Nature Biotechnology*. 2008. Vol. 26. P. 101–106.
8. Mathew R., Jia W., Sharma A., Zhao Y., Clarke L.E., Cheng X., Wang H., Salli U., Vrana K.E., Robertson G.P., Zhu J., Wang S. Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency // *FASEB J*. 2010. Vol. 24. P. 2702–2715.
9. Agarwal S., Loh Y.H., McLoughlin E.M., Huang J., Park I.H., Miller J.D., Huo H., Okuka M., Dos Reis R.M., Lowery S., Ng H.H., Keefe D.L., Goldman F.D., Klingelutz A.J., Liu L., Daley G.Q. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients // *Nature*. 2010. Vol. 464. P. 292–296.
10. Utikal J., Polo J.M., Stadtfeld M., Maherali N., Kulalert W., Walsh R.M., Khalil A., Rheinwald J.G., Hochdinger K. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells // *Nature*. 2009. Vol. 460. P. 1145–1148.
11. Yehzekel S., Rebibo-Sabbah A., Segev Y., Tzukerman M., Shaked R., Huber I., Gepstein L., Skorecki K., Selig S. Reprogramming of telomeric regions during the generation of human induced pluripotent stem cells and subsequent differentiation into fibroblast-like derivatives // *Epigenetics*. 2011. Vol. 6. P. 63–75.
12. Schepers W., Copray S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch // *Stem Cell Rev*. 2009. Vol. 5(3). P. 204–223.
13. Patel M., Yang S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells // *Stem Cell Rev*. 2010. Vol. 6(3). P. 367–380.
14. Егоров Е.Е. Теломераза, старение, рак // *Молекулярная биология*. 1997. Т. 31. С. 16–25.
15. Егоров Е.Е., Молдавер М.В., Вишнякова Х.С., Терехов С.М., Дашинимаев Э.Б., Чеглаков И.Б., Торопыгин И.Ю., Ярыгин К.Н., Чумаков П.М., Корочкин Л.И., Антонова Г.А., Рыбалкина Е.Ю., Сабурова И.Н., Бурнаевский Н.С., Зеленин А.В. Усиление контроля пролиферации в теломеризованных клетках // *Онтогенез*. 2007. Т. 38, № 2. С. 105–19.

16. *Armstrong L., Saretzki G., Peters H., Wappler I., Evans J., Hole N., von Zglinicki T., Lako M.* Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage // *Stem Cells*. 2005. Vol. 23(4). P. 516—529.

17. *Zvereva M.I., Shcherbakova D.M., Dontsova O.A.* Telomerase: structure, functions, and activity regulation // *Biochemistry*. 2010. Vol. 75(13). P. 1563—83.

18. *Bryan T.M., Englezou A., Gupta J., Bacchetti S., Reddel R.R.* Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity // *EMBO J*. 1995. Vol. 14(17). P. 4240—4248.

19. *Wright W.E., Shay J.W.* Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence // *Trends Genet.* 1992. Vol. 8(6). P. 193—197.

Поступила в редакцию
04.07.11

INDUCTION OF TELOMERASE ACTIVITY INCREASE REPROGRAMMING EFFICIENCY OF HUMAN DERMAL FIBROBLASTS

*E.B. Dashinimaev, I.A. Muchkaeva, R.R. Faizullin, Y.Y. Yegorov,
S.S. Akimov, V.V. Terskikh, A.V. Vasiliev, M.P. Kirpichnikov*

Reprogramming of human cells are a perspective direction of development of cellular biology with distant prospect of use of the given methods for cellular-replacing therapy in clinical practice. One of problems rising on this way is low reprogramming efficiency and application of undesirable oncogenes in initial techniques. In this research we had been offered the alternative modified method of reprogramming human skin fibroblasts. It has been shown that the telomerase induction increases an exit of reprogrammed cells and allows to exclude oncogen c-Myc from a used set of genes.

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

Сведения об авторах

Дашинимаев Эрдэм Баирович — канд. биол. наук, науч. сотр., Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: dashinimaev@gmail.com

Мучкаева Ирина Алексеевна — ст. лаборант, специалист в высшим биологическим образованием, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: izomerizaciya@list.ru

Файзуллин Рузель Рафаэлевич — бакалавр физ.-мат. наук, лаборант, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: ruzel_faizullin@mail.ru

Егоров Егор Евгеньевич — докт. биол. наук, вед. науч. сотр., Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Тел.: 8-499-135-98-06; e-mail: yegorov58@mail.ru

Акимов Сергей Сергеевич — PhD, Department of Anatomy and Cell Biology, The George Washington University Medical Center, 2300 I Street NW, Washington, DC 20037, USA. E-mail: sergey_email2000@mail.ru

Васильев Андрей Валентинович — докт. биол. наук, зам. директора, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-76-74; e-mail: 113162@bk.ru

Терских Василий Васильевич — докт. биол. наук, зав. лабораторией, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: terskikh@list.ru

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, декан биологического факультета, зав. кафедрой биоинженерии МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-27-76.