**Разработка репортерной системы для детекции G-квадруплексных структур в промоторной области гена *TERT* человека**

***Якушкина Ю.В.***

*Студент 6 курс, специалитет*

*Московский государственный университет имени М.В, Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail:* [*dddd80486@gmail.com*](mailto:dddd80486@gmail.com)

Из-за неспособности ДНК-полимераз начинать синтез без праймера в ходе каждого клеточного деления концевые участки хромосом, теломеры, укорачиваются на 3-6 нуклеотидов. Длины теломер человека хватает на ~50 клеточных делений, после чего большинство соматических клеток подвергаются апоптозу. Однако в клетке существует теломераза, отвечающая за поддержание длины теломер. Она добавляет к концу теломер определённую тандемную последовательность на РНК-матрице. Обратная транскриптаза теломеразы человека (*hTERT*) является её каталитической субъединицей, и её повышенная экспрессия связана с появлением опухоли в большинстве изученных случаев.

Промоторная область *hTERT* содержит G-богатую область длиной в 68 нуклеотидов, способную формировать 3 тандемных параллельных G-квадруплекса (G4). Хорошо известно, что G4 ингибируют действие как ДНК-полимераз, так и РНК-полимераз эу- и прокариот. Возникающая замена G>A дестабилизирует G4-структуру, тем самым делая последовательность более доступной для связывания различными белковыми факторами, что приводит к реактивации активности теломеразы. Таким образом, стабилизацию G4-структуры в промоторе можно рассматривать как возможный путь снижения экспрессии *hTERT* и роста опухоли.

Целью работы являлось получение плазмидных конструкций, содержащих промоторную область *hTERT*, и определение влияния G4 на экспрессию гена репортёрного белка.

Методами молекулярного клонирования получены репортёрные конструкции на основе плазмиды pRFPCER, содержащей гены двух флуоресцентных белков RFP и Cerulean и последовательность центрального G4 промоторной области *hTERT* в 5′-нетранслируемой области гена Cerulean. В качестве контроля выбрана вставка, содержащая G-богатую последовательность из промотора *c-Myc*, образующая стабильный G4. Доказано образование G4 в плазмидной конструкции методом «остановки» полимеразы. Установлено, что уровень относительной флуоресценции Cerulean/RFP клеток *E. coli*BW25113*(ΔtolC)*, содержащих репортёрные конструкции, коррелирует со стабильностью G4, находящегося во вставке — чем стабильнее G4, тем меньший уровень относительной флуоресценции наблюдается. Минимальный уровень флуоресценции обнаружен для вставки дикого типа и *c-Myc*. Максимальная флуоресценция детектируется для клеток с конструкциями без вставки и со вставкой с двумя мутациями G228A, G250A. Методом ОТ-кПЦР показано влияние G-богатых вставок на транскрипцию Cerulean. Относительное количество мРНК Cerulean коррелирует с уровнем относительной флуоресценции Cerulean/RFP.

Изучено влияние G4-стабилизирующих лигандов BRACO19, TMPyP4, PhenDC3 на синтез репортёрного белка. BRACO19 и TMPyP4 способны стабилизировать G4 в клетках, содержащих конструкции со вставками дикого типа и с заменами G228A и G250A, в диапазоне концентраций 5-25 мкМ. PhenDC3 не оказывает существенного влияния на синтез Cerulean. Рассчитана минимальная ингибирующая концентрация BRACO19, составляющая 100 мкМ, TMPyP4 — > 80 мкМ и PhenDC3 — > 300 мкМ. Для BRACO19 EC50 составляет 25 мкМ для клеток с конструкциями, содержащими вставки дикого типа, мутации G228A, G250A и *c-Myc*, для TMPyP4 — 10 мкМ для G228A и 25 мкМ для G250A.

*Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ, проект 25-24-00161.*