

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСОВ 7-АМИНОАКТИНОМИЦИНА С ТЕЛОМЕРНЫМ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОМ $d[AGGG(TTAGGG)_3]$

© 2018 г. В.И. Ковалев, Н.Л. Векшин

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: nvekshin@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.05.17 г.

Изучено взаимодействие 7-аминоактиномицина Д (флуоресцентного аналога противоопухолевого антибиотика актиномицина Д) с двумя структурными формами модельного теломерного олигонуклеотида  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ , обогащенного гуанином. Показана чувствительность флуоресценции 7-аминоактиномицина Д к двум разным G-квадруплексным структурам, формирующимся в присутствии ионов калия или натрия. С помощью анализа спектров возбуждения найдена энтальпийная энергия взаимодействия феноксазонового хромофора антибиотика с теломерным олигонуклеотидом. Она равна 5,5 ккал/моль, что мало отличается от комплексов с агрегатами гуанина, аденина или тимина (6–7 ккал/моль). В олигонуклеотиде антибиотик находится внутри динамических полостей. Поэтому антибиотик не способен высвободиться из теломерных структур в водную фазу ни спонтанно, ни даже при фотовозбуждении, но легко освобождается с поверхности агрегатов соответствующих нуклеотидов. Энтропийная часть энергии взаимодействия, найденная как разность между общей энергией, определенной из константы связывания, и энтальпийной, определенной из спектров возбуждения, составляет около 30% в случае теломерного олигонуклеотида и является практически нулевой при взаимодействии с агрегатами оснований.

*Ключевые слова:* актиномициновые антибиотики, актиномицин, теломеры, олигонуклеотиды, G-квадруплексы, флуоресцентная спектроскопия.

Существует много работ по изучению взаимодействия противоопухолевого антибиотика актиномицина Д (АМД) с ДНК. Ранее в нашей лаборатории было показано [1–3], что основным местом связывания АМД при его низких физиологических концентрациях является не двойная спираль, а расплетенные участки.

В ДНК имеются также свёрхупорядоченные участки. В частности, к последним можно отнести теломеры. Теломерные участки расположены на концах хромосом и имеют особую последовательность нуклеотидов, причем они обогащены гуанином. Для теломерных участков ДНК млекопитающих (включая человека) известна последовательность повторяющихся нуклеотидов:  $TTAGGG$ . Обогащенные гуанином участки образуют свёрхупорядоченные структуры за счет водородных связей между молекулами гуанина, находящимися в одной плоскости; такие структуры называют G-квадруплексами. Структура квадруплексов установлена *in vitro* по данным ЯМР и рентгеноструктурного

анализа [4]. В настоящее время еще нет достаточно надежных доказательств наличия G-квадруплексов *in vivo* [5].

В данной работе исследуется взаимодействие 7-аминоактиномицина Д (7ААМД – флуоресцентный аналог АМД) с синтетическим олигонуклеотидом  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ , моделирующим нуклеотидную последовательность теломерных участков. Этот аналог позволяет проводить детекцию взаимодействия антибиотика с олигонуклеотидом, с кластерами нуклеотидов и с ДНК при его низких (микромольных), но физиологически важных концентрациях.

Актиномицины, состоящие из феноксазонового хромофора и двух пептидолактонных колец, являются очень эффективными природными противоопухолевыми средствами [6,7]. АМД в малых количествах хорошо связывается с расплетенными участками ДНК [1–3], стабилизирует их и повышает температуру плавления, но имеет низкое сродство к двойной спирали. При этом, однако, нет никаких запретов на взаимодействие между ним и теломерами.

Известно, что прием актиномицинов оказывает существенное положительное влияние

Сокращения: АМД – актиномицин Д, 7ААМД – 7-аминоактиномицин Д.

на продолжительность жизни мышей [8]. В принципе это может быть связано не только со стабилизацией расплетенных участков, но и с регуляцией теломерных участков. Более того, показано взаимодействие АМД с G-квадруплексом человеческой теломерной последовательности [9]. Это взаимодействие было изучено при слишком большом количестве антибиотика относительно оснований квадруплекса, т.е. такие условия не являются физиологическими. Тем не менее антибиотик все же стабилизировал структуры и повышал их температуру плавления.

При высоких концентрациях АМД или 7ААМД интеркалирует между основаниями ДНК и денатурирует ее. При низких концентрациях антибиотик, наоборот, стабилизирует ДНК, так как встраивается в расплетенные участки, повышая температуру плавления. Именно низкие концентрации антибиотика (по отношению к нуклеотидам) являются физиологическими и объясняют противоопухолевое действие антибиотика и увеличение продолжительности жизни животных. Только флуоресцентный метод с использованием 7ААМД позволяет работать с микромолярными концентрациями. Ни рентгеноструктурный анализ, ни круговой дихроизм, ни дифференциальная сканирующая калориметрия не позволяют этого делать.

Цель данной работы – изучение с помощью высокочувствительной флуоресцентной спектроскопии взаимодействия 7ААМД в малых количествах с модельным синтетическим олигонуклеотидом (в двух структурных состояниях), имеющим теломерную последовательность. Как уже было показано ранее, взаимодействие носит в основном гидрофобный характер, поэтому вклад дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты минимален [2].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Реактивы.** В работе использовали 7-аминоактиномицин Д (Sigma, США) и олигонуклеотид  $[d[AGGG(ТТАGGG)_3]]$  («ДНК-Синтез», Москва). Концентрация олигонуклеотида составляла  $10^{-4}$  М (по нуклеотидам). При этом 7ААМД добавляли в очень малой конечной концентрации, обычно не выше  $2 \cdot 10^{-6}$  М.

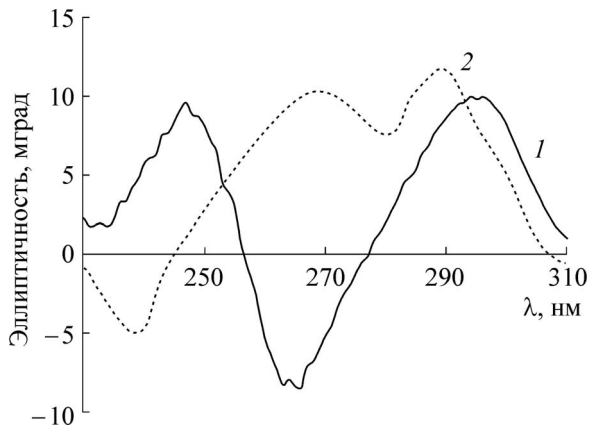
**Спектроскопия.** Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре CARY 100 (Agilent Technologies, США) в кюветах с оптическим путем от 0,1 до 1 см в диапазонах 220–300 нм (полоса поглощения нуклеотидов) и 440–600 нм (полоса поглощения 7ААМД) при комнатной температуре. Спектры возбуждения и излучения регистрировали на модернизи-

рованном спектрофлуориметре MPF-44B (PerkinElmer, США) и CARY ECLIPSE (Agilent Technologies, США). Спектры кругового дихроизма регистрировали на спектрометре Chirascan-plus qCD (Applied Photophysics, Великобритания). Время жизни возбужденного состояния 7ААМД измеряли на спектрофлуориметре FluoTime 300 (PicoQuant, Германия).

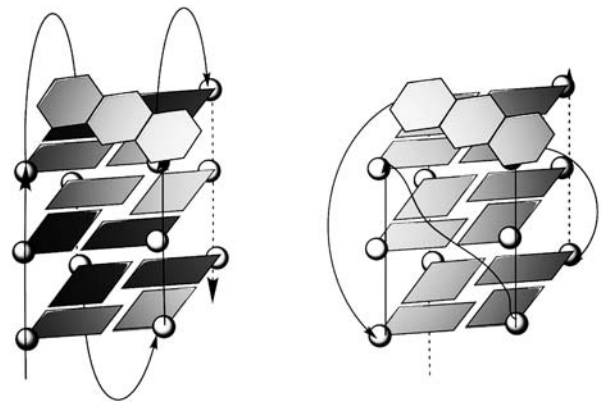
Для нахождения величины энергии взаимодействия феноксазонового хромофора антибиотика с нуклеотидами использовали разностные спектры, полученные вычитанием спектра возбуждения 7ААМД из спектра возбуждения смеси 7ААМД с теломерным олигонуклеотидом. Сначала проводили вычитание небольшого вклада светорассеяния олигонуклеотида или нуклеотида из спектра смеси (в видимой области), затем делали нормировку в максимуме на спектр свободного 7ААМД в воде или буфере, потом брали разность этих двух спектров. Процедура нормировки позволяет устранить разнонаправленные вклады в интенсивность флуоресценции от снижения коэффициента экстинкции и усиления квантового выхода 7ААМД при встраивании в агрегаты, кластеры или олигонуклеотид, а также нивелирует возможные неточности добавления веществ. Величину энергии межмолекулярного взаимодействия находили по известному соотношению  $E = h\Delta\nu$ , где  $h$  – постоянная Планка,  $\Delta\nu$  – спектральный сдвиг в шкале волновых чисел (в  $\text{см}^{-1}$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

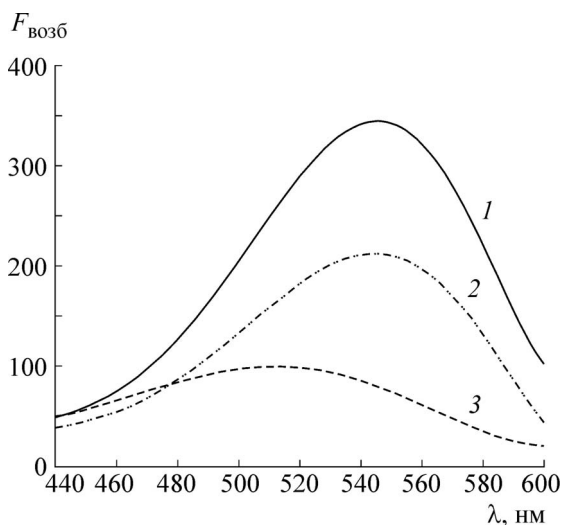
**Взаимодействие 7ААМД с модельной теломерой.** В качестве модели теломерной последовательности выбран 22-мерный олигонуклеотид  $d[AGGG(ТТАGGG)_3]$ . С олигонуклеотидом была проведена стандартная процедура отжига в двух буферах, отличающихся координационным атомом металла: буфер № 1 содержал ионы натрия (150 мМ NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,0); буфер № 2 содержал ионы калия (150 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,0). Процедура отжига заключалась в последовательном плавлении растворенного нуклеотида при 90°C в течение 5 мин и последующим его медленным (в течение 36 ч) остыванием до 4°C. В данных условиях считается, что после отжига олигонуклеотид образует G-квадруплекс, причем в зависимости от присутствия натриевой или калиевой соли в буфере получают две разные пространственные структуры [9]. Для подтверждения образования разных пространственных структур квадруплекса нами были записаны их спектры кругового дихроизма (рис. 1). Подобные спектры принято интерпретировать как об-



**Рис. 1.** Спектр кругового дихроизма  $5 \cdot 10^{-5}$  М  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$  (по нуклеотидам) в буфере 1 (1) и в буфере 2 (2).



**Рис. 2.** Схематичное изображение взаимодействия феноксазонового хромофора 7ААМД и двух разных G-квадруплексов теломерного олигонуклеотида  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ .



**Рис. 3.** Спектр возбуждения  $10^{-6}$  М 7ААМД в  $10^{-4}$  М раствора  $d[AGGG(TTAGGG)_3]$ : буфер № 1 (1), буфер № 2 (2), водный раствор (3). Излучение – 620 нм.

разование двух разных пространственных структур: в буфере 1 образуется антипараллельная структура G-квадруплекса, характеризующаяся максимумами спектра при 295 и 247 нм и минимумом при 266 нм. В буфере 2 спектр олигонуклеотида имеет совершенно иной вид, с максимумом в районе 290 нм, плечом при 268 нм и минимумом в районе 238 нм; данный спектр принято сопоставлять со смешанной параллельной-антипараллельной структурой квадруплекса (рис. 2). Полученные нами спектры кругового дихроизма теломерного олигонуклеотида аналогичны множеству аналогичных спектров, известных в литературе [10–13], поэтому вопрос их интерпретации здесь не обсуждается.

В наших опытах мы использовали избыток олигонуклеотида, чтобы антибиотик связался полностью, причем стабилизируя цепочку, а не разрушая ее (как было бы при соотношении антибиотик : нуклеотиды = 1 : 1).

При добавлении 7ААМД (в концентрации  $10^{-6}$  М) к раствору олигонуклеотида, взятому в стократно большей нуклеотидной концентрации ( $10^{-4}$  М нуклеотидов), в спектре возбуждения 7ААМД наблюдается характерный сдвиг максимума в длинноволновую область не менее чем на 20 нм (рис. 3). Спектр возбуждения антибиотика в присутствии теломерного олигонуклеотида сильно отличается от спектра возбуждения антибиотика просто в буфере. Здесь имеет место аналогия со взаимодействием антибиотика с фрагментированной ДНК [1,14,15]. Сдвиг спектра возбуждения говорит о существенном перераспределении электронной плотности в молекуле 7ААМД, т.е. о достаточно сильном взаимодействии с олигонуклеотидом (спектры возбуждения по форме и положению похожи на спектры поглощения и несут информацию об электронно-колебательных переходах поглощения, хотя детектируются по интенсивности флуоресценции, чувствительность которой в тысячу раз выше, чем спектрофотометрия). При встраивании 7ААМД в олигонуклеотид снижается коэффициент экстинкции, но резко возрастает время жизни ( $\tau$ ) и квантовый выход флуоресценции.

Энтальпийная составляющая энергии взаимодействия между хромофором 7ААМД и олигонуклеотидом может быть напрямую оценена по спектральному сдвигу в шкале волновых чисел ( $\text{см}^{-1}$ ) по методике, ранее описанной в наших работах [1,16,17]. При этом величина сдвига спектра возбуждения антибиотика при

попадании из водной фазы в теломерный олигонуклеотид составляет почти  $1930 \text{ см}^{-1}$ , независимо от вида буфера (калиевый или натриевый), что соответствует энергии взаимодействия  $\Delta H$  между хромофором антибиотика и олигонуклеотидом, равной  $5,5 \text{ ккал/моль}$ . Указанный сдвиг связан не только со специфическим взаимодействием феноксазонового хромофора с хромофорами нуклеотидов, но и со неспецифическим взаимодействием – уменьшением степени сольватации феноксазонового хромофора при попадании из водной фазы в нуклеотидную. Однако вклад сольватации наверняка не превышает  $200 \text{ см}^{-1}$ , ибо сдвиг спектра возбуждения 7ААМД при попадании из полярной воды в гидрофобный бензол составляет всего  $300 \text{ см}^{-1}$  [15]. Таким образом, энергия сольватации не превышает 10% от энтальпийной части энергии взаимодействия. Переходя от длин волн к волновым числам, мы рассчитали энтальпийный выигрыш в энергии (в табл. 1 указан модуль энергии).

Полную гиббсову энергию взаимодействия  $\Delta G$  мы определили через константу связывания  $k$  по известному уравнению  $\Delta G = 2,31gk$ . Для этого мы титровали раствор 7ААМД (в концентрации  $10^{-6} \text{ М}$ ) раствором олигонуклеотида. Затем мы представили титрационную зависимость интенсивности флуоресценции антибиотика от концентрации олигонуклеотида в обратных координатах (рис. 4), в результате чего по точке пересечения с осью абсцисс определили значение  $k$  (аналогично работе [16]). Она оказалась равной  $7,4 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1}$ , что соответствует  $\Delta G = 7,9 \text{ ккал/моль}$ .

Как известно, полная гиббсова энергия взаимодействия  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ , где второй член – энтропийный. Отсюда мы нашли, что энтропийная составляющая энергии, имеет значение  $2,4 \text{ ккал/моль}$ , что составляет порядка 30% от общей энергии.

Итак, основной вклад во взаимодействие с теломерным олигонуклеотидом вносит именно энтальпийная составляющая, которая определяется взаимодействием теломерных нуклеотидов с феноксазоновым хромофором. При этом стерический, энтропийный фактор, за который могут отвечать пептидо-лактонные кольца антибиотика, вносит меньший вклад, видимо, из-за небольших размеров G-квадруплексных структур, однако этого достаточно для того, чтобы антибиотик был хорошо связан с нуклеотидом и не «отваливался» даже при фото-возбуждении.

При этом на обычной фрагментированной ДНК, не образующей специфических структур,

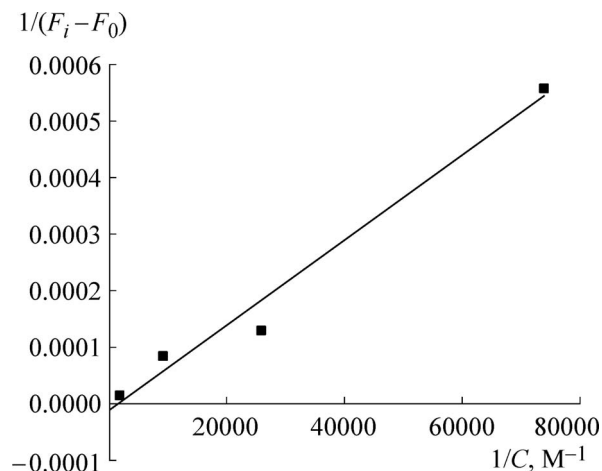


Рис. 4. График Скэтчарда зависимости флуоресценции  $10^{-6} \text{ М}$  7ААМД от концентрации теломерного олигонуклеотида в обратных координатах Температура  $20^\circ\text{С}$ , возбуждение –  $550 \text{ нм}$ , регистрация –  $620 \text{ нм}$ .

энтропийный фактор проявляется сильнее и составляет более 40% общей энергии [16] ( $5,4 \text{ ккал/моль}$  из общих  $13 \text{ ккал/моль}$ , найденных из константы связывания).

Множество литературных данных, основанных на константе связывания, дает полную энергию взаимодействия всего антибиотика, не разделяя вклады феноксазонового хромофора и пептидо-лактонных колец. При этом значения констант связывания антибиотика для разных ДНК сильно варьируют; в зависимости от вида ДНК они могут составлять от  $10^4$  до  $10^6 \text{ М}^{-1}$  [17].

В спектре излучения 7ААМД в обеих формах теломерного олигонуклеотида (рис. 5) возникает (в отличие от агрегатов пуриновых оснований и агрегатов тимина) сильный коротковолновый сдвиг, а также заметно увеличивается квантовый выход. При этом данные явления выражены гораздо меньше, чем в случае с фрагментированной ДНК [16]. В обеих теломерных структурах хромофор антибиотика флуоресцирует из достаточно гидрофобной области. Находясь в этих «внутренних» областях, он не способен к фотодесорбции.

Так как олигонуклеотид  $d[\text{AGGG}(\text{T TAGGG})_3]$  после отжига образует G-квадруплекс с петлями и шпильками, то хромофор 7ААМД встраивается, вероятно, в их динамические полости и флуоресцирует из них (рис. 2), не интеркалируя при этом между нуклеотидными плоскостями. Интенсивность излучения зависит от пространственной структуры теломерного олигонуклеотида: с G-квадруплексом, образовавшимся в присутствии ионов натрия, квантовый выход

**Таблица 1.** Параметры спектров возбуждения 7ААМД в комплексах с теломерным олигонуклеотидом и с агрегатами нуклеотидов

Спектр возбуждения 7ААМД	$\Delta\nu$ , см <sup>-1</sup>	$E$ , ккал/М
+ гуанин	2460	7
+ аденин	2370	6,8
+ тимин	2073	6
+ теломерный олигонуклеотид	1926	5,5

Примечание.  $\Delta\nu$  – спектральный сдвиг между максимумом 7ААМД в комплексе (в разностном спектре) и в воде;  $E$  – модуль энергии межмолекулярного взаимодействия.

**Таблица 2.** Параметры спектров излучения 7ААМД в комплексах с агрегатами нуклеотидов

Условия	$\lambda_{\max}$ , нм	$H_{1/2}$ , нм	$F$ , отн. ед.
В воде	658 ± 3	69	1
+ гуанин	658 ± 3	73	2
+ аденин	661 ± 3	78	1,7
+ тимин	660 ± 3	79	1,5
+ теломерный олигонуклеотид в буфере №1	640 ± 3	80	4,4
+ теломерный олигонуклеотид в буфере №2	640 ± 3	75	2,3

Примечание.  $\lambda_{\max}$  – длина волны максимума спектра;  $H_{1/2}$  – полуширина спектра;  $F$  – интенсивность флуоресценции 7ААМД (в водном растворе принята за единицу).

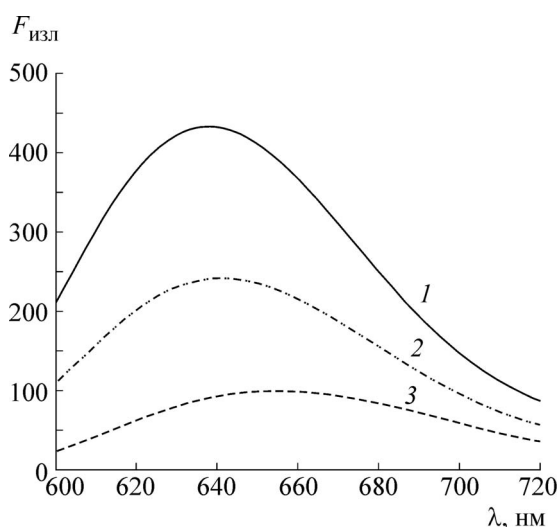
излучения антибиотика существенно больше, чем в присутствии калия (табл. 2).

Время жизни водного 7ААМД очень мало,  $\tau = 0,33$  нс, а в комплексе с теломерным олигонуклеотидом – гораздо выше. Оно практически не зависит от замены натрия на калий для двух буферов, в которых был приготовлен

G-квадруплекс:  $\tau = 1,3$  нс в буфере № 1 и  $\tau = 1,2$  нс в буфере № 2.

Итак, при сильной разнице в интенсивности флуоресценции 7ААМД в зависимости от вида структуры G-квадруплекса (которая, в свою очередь, зависит от координационного иона в буфере – натрия или калия) практически нет различия величины времени жизни  $\tau$  в двух разных G-структурах. Из этого можно сделать вывод, что в случае с буфером № 2 в большинстве комплексов происходит мгновенное тушение (деактивация) возбужденного состояния 7ААМД, вероятно, за счет более близкого расположения нуклеотидов к феноксазоновому хромофору в теломерной структуре. Комплексы, оставшиеся не затухшими, излучают с тем же  $\tau$ .

Также стоит отметить, что согласно  $\phi = \tau/\tau_p$ , где  $\phi$  – квантовый выход,  $\tau$  – измеряемое время жизни,  $\tau_p$  – радиационное время жизни (естественное, в отсутствие тушения), мы видим изменение  $\phi$  при практически неизменном  $\tau$ . Из этого можно сделать вывод о том, что в зависимости от структуры квадруплекса меняется  $\tau_p$ , т.е. по сути меняется молекулярный коэффициент поглощения и, как следствие, сам спектр поглощения (возбуждения) [19].



**Рис. 5.** Спектр излучения 10<sup>-6</sup> М 7ААМД в 10<sup>-4</sup> М раствора d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>]: буфер № 1 (1), буфер № 2 (2), водный раствор (3). Возбуждение – 550 нм.

Таким образом, антибиотик хорошо «чувствует» разницу в пространственной организации G-квадруплексов по интенсивности и спектрам (но не по  $\tau$ ) и может быть использован в дальнейшем для подобных целей, а также для изучения теломер в живых клетках.

**Взаимодействие 7ААМД с агрегатами нуклеотидов.** Гуанин, аденин и тимин в дистиллированной воде при концентрациях порядка  $10^{-4}$  М формируют неупорядоченные агрегаты [14,15]. Агрегация происходит за счет гидрофобных взаимодействий, а также водородных связей. Размер небольшого агрегата составляет около 150 Å, что многократно меньше длины световой волны. При формировании небольших агрегатов раствор остается практически прозрачным (мутность пренебрежимо мала). Также при агрегации гуанина или аденина в воде происходит снижение молярного коэффициента поглощения (за счет эффекта экранировочного гипохромизма – конкуренции стопкообразно расположенных гетероциклов за фотон [20], а также из-за молекулярного светорассеяния), но не появляются новые полосы, т.е. энергия взаимодействия между пуриновыми молекулами в агрегате невелика. Дальнейшее увеличение концентрации практически не влияет на коэффициент поглощения. При этом гуанин, находясь в виде агрегатов, не образует упорядоченных структур и не обладает особым средством к антибиотику [21–24].

Стопкообразные кластеры пуриновых и пиримидиновых оснований (но не одиночные растворенные основания) могут хорошо взаимодействовать с антибиотиком. Взаимодействие характеризуется сдвигом максимума спектра возбуждения антибиотика (табл. 1) и увеличением квантового выхода, однако, в отличие от случая с теломерным олигонуклеотидом, коротковолновый сдвиг спектра излучения отсутствует (табл. 2). Агрегаты нуклеотидов не имеют внутренних «полостей», поэтому связывание с хромофором 7ААМД происходит на поверхности этих агрегатов. Соответственно, энтропийного вклада практически нет. Это можно понять, сравнив общую энергию, найденную через константу связывания (7,3 ккал/моль), с энтальпийной составляющей, вычисленной из спектров поглощения (7 ккал/моль) [16]. На энтропийную составляющую приходится всего 0,3 ккал/моль. Поэтому при облучении светом 7ААМД имеет место его фотодесорбция, при которой тепловая разность энергии между возбуждением и излучением расходуется на разрыв связи хромофора с агрегатом и выходом антибиотика в водную фазу [1,16,18].

Важно отметить, что при очень низких концентрациях нуклеотидов, когда они не агрегированы, антибиотик с ними не взаимодействует (нет изменений его флуоресценции). Антибиотик не имеет средства к отдельным нуклеотидам, но имеет средство к нуклеотидным структурам.

## ВЫВОДЫ

Флуоресцентный метод применен для нахождения энергии взаимодействия феноксазонавого хромофора гетероциклического антибиотика с основаниями теломерной последовательности ДНК, а также пуриновыми агрегатами и кластерами тимина. На модели гетероциклических оснований дана предпосылка к изучению взаимодействия антибиотика с теломерными последовательностями. Продемонстрировано, что при фотовозбуждении антибиотик высвобождается с поверхности нуклеотидных кластеров в водную фазу, но не высвобождается из теломерного олигонуклеотида. Найдена энергия взаимодействия актиномицинового хромофора с теломерными участками. Показано взаимодействие 7ААМД с модельным олигонуклеотидом теломерного участка d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>]. При этом особенно важно, что флуоресценция 7ААМД чувствительна к структуре G-квадруплексов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. И. Ковалев и Н. Л. Векшин, *Биоорганическая химия* **40** (5), 588 (2014).
2. N. Vekshin, I. Savintsev, A. Kovalev, et al., *J. Phys. Chem.* **105**, 8461 (2001).
3. И. В. Савинцев и Н. Л. Векшин, *Молекулярная биология* **36** (4), 725 (2002).
4. Y. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2719 (2011).
5. H. J. Lipps and D. Rhodes, *Trends Cell Biol.* **19** (8), 414 (2009).
6. Н. С. Егоров, А. Б. Силаев и Г. С. Катруха, *Антибиотики-полипептиды* (Изд-во МГУ, М., 1987).
7. Г. Ф. Гаузе и Ю. В. Дудник, *Противоопухолевые антибиотики* (Медицина, М., 1987).
8. В. В. Фролькис и Х. К. Мурадян, *Экспериментальные пути продления жизни* (Наука, Л., 1988).
9. J. S. Hudson, S. C. Brooks, and D. E. Graves, *Biochemistry* **48**, 4440 (2009).
10. P. Balagurumoorthy and S. K. Brahmachari, *J. Biol. Chem.* **269**, 21858 (1994).
11. C.C. Hardin, E. Henderson, T. Watson, and J. K. Prosser, *Biochemistry* **30**, 4460 (1991).
12. J. Dai, C. PUNCHIHEWA, A. Ambrus, et al., *Nucl. Acids Res.* **35**, 2440 (2007).

13. C. Antonacci, J. B. Chaires, and R. D. Sheardy, *Biochemistry* **46**, 4654 (2007).
14. N. L. Vekshin, *Photonics of Biopolymers* (Springer, Berlin, 2002).
15. Н. Л. Векшин, *Биофизика ДНК-актиномициновых комплексов* (Фотон-век, Пушино, 2009).
16. N. L. Vekshin and V. I. Kovalev, *J. Biochem.* **159** (1), 59 (2016).
17. R. M. Wadkins, E. A. Jares-Erijman, R. Klement, et al., *J. Mol. Biol.* **262**, 53 (1996).
18. М. М. Хайретдинова и Н. Л. Векшин, *Биоорганическая химия* **40** (1), 64 (2014).
19. А. Н. Теренин, *Фотоника молекул красителей и родственных органических соединений* (Наука, 1967).
20. Н. Л. Векшин, *Флуоресцентная спектроскопия биополимеров* (Фотон-век, Пушино, 2006).
21. R. M. Wadkins, V. Vladu, and C. Tunng, *Biochemistry* **37**, 11915 (1998).
22. R. M. Wadkins, C. Tunng, P. M. Vallone, and A. S. Benight, *Arch. Biochem. Biophys.* **384**, 199 (2000).
23. F.-M. Chen, F. Sha, K.-H. Chin, and S.-H. Chou, *Biophys. J.* **84**, 432 (2003).
24. И. В. Савинцев и Н. Л. Векшин, *Прикл. биохимия и микробиология* **40** (4), 421 (2004).

## Fluorescence Analysis of 7-Aminoactinomycin-Telomeric Oligonucleotides d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] Complexes

V.I. Kovalev and N.L. Vekshin

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Interactions of 7-aminoactinomycin D (a fluorescent analogue of actinomycin D, an anticancer antibiotic) and two structural forms of model guanine-rich telomeric oligonucleotide d[AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>] have been studied. We have shown that 7-aminoactinomycin D induces fluorescence in two different G-quadruplex structures formed in the presence of potassium or sodium ions. Having analyzed excitation spectra, the enthalpy of interaction between the phenoxasone chromophore of the antibiotic and telomeric oligonucleotide has been determined. It was found to be 5.5 kcal/mol. The findings differ little from those obtained for complexes with guanine, adenine, or thymine clusters (6–7 kcal/mol). In the oligonucleotide, the antibiotic is located within the dynamic “cavities”. As a result, 7-aminoactinomycin D is unable to release into the aqueous phase from telomeric structures spontaneously or even by photoexcitation, but able to do it easily from the surface of aggregates of the relevant nucleotides. The entropy of the interaction energy calculated as a difference between total energy determined from the binding constant and the enthalpy determined from the excitation spectra amounts to 30% in case of a telomeric oligonucleotide and is virtually null when interacting with base aggregates.

*Keywords: actinomycin antibiotics, actinomycin, telomeres, oligonucleotides, G-quadruplexes, fluorescence spectroscopy*