

ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ЛЕГКИХ – ПРОДУЦЕНТЫ МИКРОБНОЙ РНКАЗЫ (БИНАЗЫ)

Е.В. Дудкина¹, И. Сайн², В.В. Ульянова¹, Р. Шах Махмуд¹, Г. Баррето², О.Н. Ильинская¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Исследовательский институт сердца и легких им. Макса-Планка, Бад Наухайм, Германия

Transformed lung epithelial cells produce microbial RNase (binase)

E.V. Dudkina¹, I. Singh², V.V. Ulyanova¹, R. Shah Mahmud¹, G. Barreto², O.N. Ilinskaya¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

² Max-Planck Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany

На сегодняшний день одним из ведущих направлений в противоопухолевой терапии является создание систем адресной доставки лекарственных средств в очаги развития злокачественных новообразований. С использованием методов генной инженерии нами была создана новая экспрессионная система, где гены рибонуклеазы *Bacillus pumilis* – биназы, и сцепленного с ним гена внутриклеточного ингибитора *Bacillus amyloliquefaciens* – барстара, клонированы в вектор pCS2+. Показана возможность экспрессии гена биназы в трансформированных эпителиальных клетках легких мыши. Полученная векторная конструкция обеспечит селективное цитотоксическое действие биназы на опухолевые клетки-мишени, обусловленное высоким уровнем экспрессии чужеродного белка в трансформированных клетках.

Ключевые слова: биназа, экспрессионная система, pCS2+, MLE-12, секреция.

Злокачественные опухолевые заболевания находятся на втором месте после сердечно-сосудистых по количеству смертей и являются одной из основных причин смертности в мире. По данным ВОЗ, в 2012 году от злокачественных опухолей умерло более 8,2 млн человек [1]. Большая часть смертей зарегистрирована в развивающихся странах, для которых современные способы ранней диагностики и эффективного лечения злокачественных новообразований остаются малодоступными. В России от рака ежегодно умирает более 285 000 человек [2]. На сегодняшний день одним из ведущих направлений в противоопухолевой терапии является создание систем адресной доставки лекарственных средств в очаги злокачественных новообразований [3]. Предпосылкой к развитию данной тенденции послужила неэффективность фармацевтического лечения при традиционных способах введения препаратов, поскольку в этом случае действие лекарств является общим, проникая не только в органы-мишени, но и в другие ткани, где часто обладает нежелательными эффектами. При этом лечебная доза терапевтического средства значительно снижается, что вынуждает применять дозы, на несколько порядков превышающие необходимые [4].

Наиболее перспективным методом лечения онкологических заболеваний, отличающимся высокой степенью целевой направленности препарата, является генотерапия [5]. Данный вид лечения заключается во введении специальных терапевтических генетических конструкций в клетки организма. Доставку гена производят с помощью вирусных или невирусных систем, ex vivo или in vivo [5]. Подходы генной терапии основаны на многофакторности онкологических заболеваний [6], среди них различа-

ют: введение генов-супрессоров опухолевого роста; генов, обеспечивающих устойчивость к противоопухолевым средствам для проведения более активной химиотерапии; ингибирование доминантных генов; а также методы иммуностимуляции и введения генов пролекарств [5]. Генотерапия потенциально может обеспечить эффективную доставку чужеродного гена в клетки-мишени, а также его длительную экспрессию в них.

Key words: binase, expression system, pCS2+, MLE-12, secretion.

ют: введение генов-супрессоров опухолевого роста; генов, обеспечивающих устойчивость к противоопухолевым средствам для проведения более активной химиотерапии; ингибирование доминантных генов; а также методы иммуностимуляции и введения генов пролекарств [5]. Генотерапия потенциально может обеспечить эффективную доставку чужеродного гена в клетки-мишени, а также его длительную экспрессию в них.

Одними из основных критериев для практического применения противоопухолевого средства являются его селективное действие по отношению к раковым клеткам и низкая иммуногенность препарата [7]. Поэтому особое внимание привлекают ферменты – рибонуклеазы (РНКаза), обладающие селективной цитотоксичностью по отношению к злокачественным клеткам. Наиболее известным представителем РНКаз животного происхождения является РНКаз овоцитов лягушки *Rana pipiens* – онконаза, достигшая III фазы клинических исследований в протоколе лечения мезотелиомы легких человека [8]. Препарат используется в комплексной терапии с противоопухолевым антибиотиком – доксорубицином [9].

Среди микробных РНКаз особое место занимает РНКаз *Bacillus pumilis* – биназа. Это фермент селективно ингибирует рост клеток, экспрессирующих *ras*, *kit* и *AML-ETO* онкогены, при этом не оказывая значимого токсического действия на нормальные клетки [10–12]. Кроме того, показано, что биназа не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ, что говорит о ее низкой иммуногенности [13]. Перечисленные свойства позволяют рассматривать биназу в качестве активного вещества потенциального противоракового препарата. Однако при введении чужеродных ферментов в живой организм они

быстро утрачивают свою активность вследствие действия внутриклеточных протеаз и ряда других факторов, что, возможно, объясняет невысокие показатели клинических испытаний онконазы. В связи с этим очевидна необходимость защиты и пролонгации функционирования введенного фермента в организме.

В настоящей работе нами была создана векторная конструкция, на основе которой ген биназы на плазмидном векторе pCS2+ был введен в опухолевые клетки MLE-12 эпителия легких мыши. Экспрессия гена и секреция фермента подтверждены иммуноблотингом. Биназа оказывала токсическое действие на линию трансформированных клеток легких без интернализации фермента [14]. В перспективе биназа, экспрессирующаяся в эпителии легких, может адресно воздействовать на опухолевые клетки, не оказывая при этом токсического действия на здоровые клетки организма.

Материал и методы

Плазмиды и клетки

В работе были использованы: плазида pMZ55, несущая полный ген РНКазы *B. pumilis* и сцепленный с ним ген внутриклеточного ингибитора *B. amyloliquefaciens* – барстара, сконструированная Знаменской с соавторами [15], и коммерческий вектор pCS2+, обеспечивающий экспрессию биназы в клетках млекопитающих. Трансформированные клетки эпителия легких мыши (MLE-12) были получены из коллекции клеточных культур США (ATCC CRL-2110). Клетки выращивали при 37°C на стандартной среде DMEM (Invitrogen, США) с добавлением 5% телячьей сыворотки и пенициллина/стрептомицина (по 100 ед.) в атмосфере 5% CO₂. Химически компетентные клетки *E. coli* Top10 предоставлены компанией Invitrogen (США).

Создание генетической конструкции

Ген РНКазы и барстара амплифицировали с плазмиды pMZ55 с использованием двух пар праймеров Bin-For-EcoRI и Rnase-Brst-Rev-XhoI, содержащих сайты рестрикции XhoI и EcoRI, сконструированных сотрудниками лаборатории «Биоинженерии и биосинтеза ферментов» К(П)ФУ, производитель (СиБЭнзим, Россия).

Bin-For-EcoRI:

ATCGTGAATTCTATTATTTTCATCAGAAGGTTATC

Rnase-Brst-Rev-XhoI:

GCTGATCTCGAGGGGTTTGTGTTCCATATTG

Условия реакции: 94°C – 2 мин, 94°C – 15 с, 55°C – 30 с, 68°C – 90 с, всего – 30 циклов. Реакцию проводили с использованием термоциклера «Т3000» (Biometra, Германия). ПЦР-продукт, содержащий сайты рестрикции Xho I и Eco RI, и ДНК вектор pCS2+ гидролизовали рестриктазами Xho I и Eco RI (Invitrogen, США). Рестриктирование проводили при температуре 37°C в течение 8 ч. Количество ДНК вектора в реакции составляло 4–6 мкг, ПЦР-продукта – 500 нг. Рестриктазы инактивировали при температуре 80°C в течение 20 мин.

С целью очистки рестрицированного вектора плазмидную ДНК наносили на агарозный гель и выделяли из геля с использованием набора «PureLink Quick Gel Extraction kit» (Invitrogen, США). ПЦР продукт очищали «PureLink PCR Purification Kit» (Invitrogen,

США) в соответствии с инструкцией производителя. Продукт амплификации лигировали с вектором pCS2+ с использованием T4 – лигазы (Thermo Scientific, США). Лигирование проводили при температуре 16°C в течение 6 ч. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Top10.

Трансформация и анализ векторной ДНК

Компетентные клетки *E. coli* Top10 (Invitrogen, США) трансформировали лигазной смесью. К 50 мкл химически компетентных клеток добавляли 1/2 объема лигазной смеси. Клетки подвергали температурному шоку, выдерживая во льду в течение 30 мин, затем 90 с при 42°C, и снова во льду в течение 2 мин. Далее к клеткам добавляли 400 мкл среды LB, инкубировали в течение 1 ч при 37°C с аэрацией. Высеивали на чашки с L-агаром и ампициллином, выращивали при 37°C 14–16 ч.

Для подтверждения встраивания клонируемого фрагмента в состав вектора pCS2+ плазмиды выделяли из рекомбинантных клонов *E. coli* Top10 с использованием «PureLink Quick Plasmid MiniPrep Kit» (Invitrogen, США) и анализировали с помощью ПЦР и рестрикционного анализа, как описано выше.

Трансфекция

Полученной генной конструкцией трансфицировали клетки MLE-12 и выращивали в течение 48 ч. Трансфекцию проводили с использованием «Липофектамина 2000» (Invitrogen, США) согласно инструкции производителя. В качестве отрицательного контроля клетки трансфицировали вектором pCS2+ без вставки, положительным контролем служил вектор, экспрессирующий флуоресцентный белок GFP, меченый мус-полипептидом (Invitrogen, США).

После роста в течение 48 ч клетки собирали, промывали в PBS-буфере и центрифугировали на холоду при 1200 rpm 10 мин. Белки в супернатанте осаждали по стандартной методике [16]. Клеточный осадок ресуспензировали в 300 мкл лизирующего буфера (50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 15 mM ЭДТА, 0,4% Тритон X-100, 0,2 mM Имидазол, 20 mM NaF, 0,5 mM Na₃VO₄, 40 мкг/мл PMSF, pH 7,4), разрушали ультразвуком (5 циклов по 10 с) и центрифугировали на холоду при 14 000 rpm 10 мин. Супернатант собирали для проведения электрофореза в ПААГ.

Электрофорез в ПААГ и вестерн блот

Электрофорез в 15% полиакриламидном геле проводили согласно стандартной методике, описанной Лэммли [17]. После разделения белков в ПААГ, белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану, центры связывания блокировали добавлением 5% сухого молока в буфере TBS. Мембрану инкубировали с первичными антителами против мус-белка (1:2000) (Santa Cruz, США) в течение ночи при 4°C. Не связавшиеся антитела отмывали, мембрану инкубировали с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Детекцию иммунных комплексов проводили с использованием «Super Signal West Femto detection solutions» (Thermo Scientific, США) на гель-документаторе Luminescent Image Analyzer (Las 4000, Fujifilm, Япония).

Зимограмма

Оценку каталитической активности фермента проводили путем разделения белков в 15% полиакриламидном геле по модифицированной методике Лэммли [17], в качестве субстрата в разделяющий гель добавляли дрожжевую РНК (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 7 мг/мл. После электрофоретического разделения белков, гель отмывали по 10 мин в буфере I (10 мМ Трис-НСl, 20% изопропанол, рН 7,5), буфере II (10 мМ Трис-НСl, рН 7,5) и буфере III (100 мМ Трис-НСl, рН 7,5). Окрашивание гелей проводили в 0,2% растворе толуидинового синего (Sigma-Aldrich, США).

Результаты и обсуждение

Гены рибонуклеазы *Bacillus pumilus* – биназы и сцепленного с ним гена внутриклеточного ингибитора *B. amyloliquefaciens* – барстара были клонированы в вектор рСS2+, способный экспрессироваться в клетках млекопитающих. На первом этапе с помощью ПЦР гены РНКазы и барстара были амплифицированы с плазмиды рМZ55 с использованием двух пар праймеров Bin-For-EcoRI и Rnase-Brst-Rev-XhoI, несущих сайты рестрикции EcoRI и XhoI (рис. 1). Плазмида рМZ55 была сконструирована Знаменской с соавторами [15] с целью эффективной экспрессии биназы в клетках *B. subtilis*. Ампликон, полученный с плазмиды рМZ55, и вектор рСS2+ рестрицировали по сайтам EcoRI и XhoI с образованием липких концов. Полученные фрагменты лигировали, лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Top 10. Отбор клонов проводили на питательной среде с ампициллином. Успешность

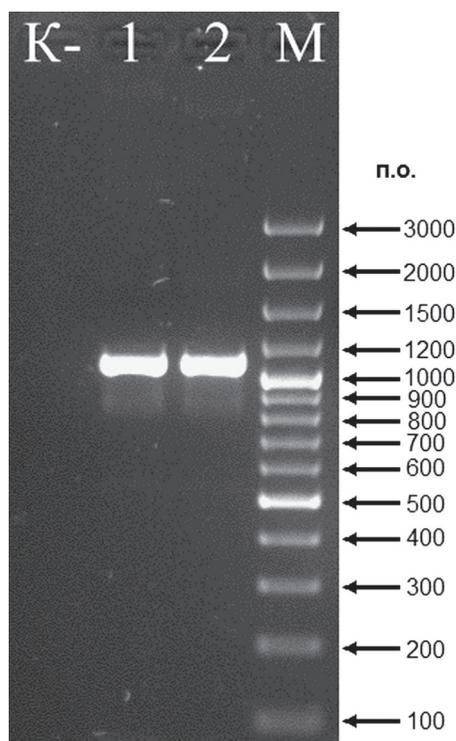


Рис. 1. Амплификация гена биназы и сцепленного с ним гена барстара с плазмиды рМZ55 с использованием двух пар праймеров Bin-For-EcoRI и Rnase-Brst-Rev-XhoI: 1, 2 – ПЦР-продукт с рМZ55; К(-) – отрицательный контроль; М – ДНК маркер «100 bp plus»

клонирования была подтверждена ПЦР (рис. 2), рестрикцией (рис. 3) и секвенированием полученной векторной конструкции, сборка фрагментов которой выявила наличие полноразмерного гена биназы (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00649>) и барстара (<http://www.uniprot.org/uniprot/P11540>). Размер ПЦР-продукта, созданных векторных конструкций, совпадал с ампликоном рМZ55, что подтверждает наличие вставки в составе вектора рСS2+ (рис. 2). Рестрикция векторных конструкций эндонуклеазами EcoRI и XhoI, имеющими по одному сайту рестрикции, показала наличие двух полос на электрофорезе, соответствующих размеру клонируемого гена и вектора (рис. 3). Ген РНКазы в составе вектора рСS2+ мечен тус-белком, позволяющим детектировать биназу анти-тус антителами.

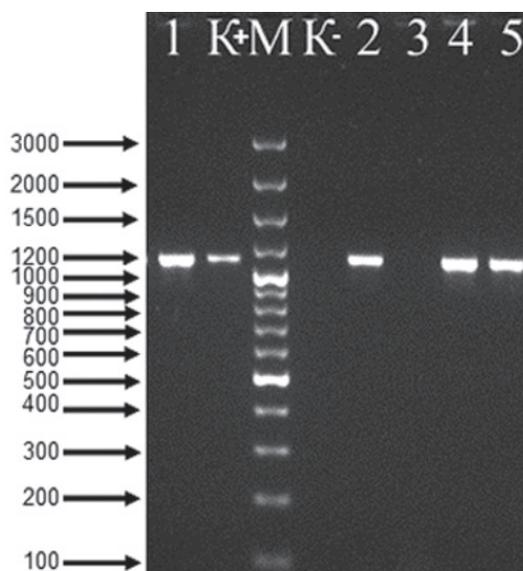


Рис. 2. ПЦР полученной векторной конструкции, выделенной из клонов *E. coli* Top10 после трансформации: 1–5 – векторные конструкции клонов *E. coli* Top10; К(-) – отрицательный контроль; К(+)- положительный контроль (амплификация с плазмиды рМZ55); М – ДНК маркер «100 bp plus»

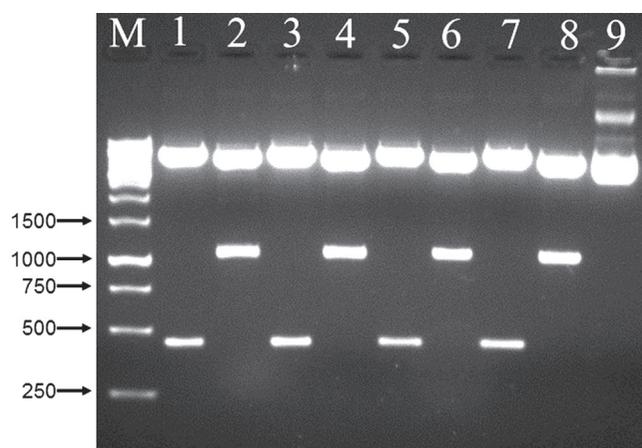


Рис. 3. Рестрикция готовых векторных конструкций, выделенных из клонов *E. coli* Top10: 1, 3, 5, 7 – гидролиз векторных конструкций эндонуклеазой XbaI; 2, 4, 6, 8 – гидролиз векторных конструкций эндонуклеазами EcoRI и XhoI; 9 – нерестрицированный вектор рСS2+; М – ДНК маркер «1 kb plus»

Сконструированная векторная система была трансфицирована в клетки MLE-12. В качестве положительного контроля использовали векторную систему, экспрессирующую ген флуоресцентного белка GFP. Высокая интенсивность флуоресценции маркерного белка подтвердила успешность проведенной трансфекции. Результаты экспрессии гена биназы показали, что вестерн блот анализ с применением антител против тус удостоверяет наличие ферментного белка в супернатанте трансформированных клеток (рис. 4). Отсутствие биназы в клеточном лизате MLE-12 подтверждает факт, что белок секретировался в среду. Отметим, что как отрицательный (лиофилизированный препарат биназы), так и положительный (GFP-тус tag белок) контрольные варианты свидетельствуют о достоверности полученных данных (рис. 4).

Размер детектируемого продукта составил 25 кДа, что, вероятно, говорит о взаимодействии антител с димерной формой биназы. Стандартная масса мономерной биназы 12 кДа, однако, мы не выявили соответствующую мономерную полосу на вестерн блоте (рис. 4). Поскольку детекцию осуществляли антителами к тус, ген которого встроен в плазмиду pCS2+ до структурного гена биназы, экспрессирующийся полипептид метит одну молекулу биназы. Вероятно, димеризация белка происходит на стадии трансляции, что мешает тус присоединиться к мономеру и затрудняет его детекцию в данной системе. На сегодняшний день многие авторы сообщают о возможности димеризации РНКазы *V. vulnificus*. Хотя доказательства димеризации базируются на исследованиях кристаллической структуры фермента [18, 19], при высоких концентрациях белка образование димеров может происходить и в растворе [19, 20]. С целью подтверждения полученных результатов, а также для исключения возможности секреции мономера биназы совместно с ингибитором барстаром, нами была проведена качественная оценка каталитической активности фер-

мента в полиакриламидном геле. Было показано, что биназа расщепляет РНК и образует зоны гидролиза, соответствующие молекулярной массе 12 и 25 кДа. Те же данные были получены для лиофилизированного препарата биназы, что говорит о наличии у белка димерной формы (рис. 5).

Отметим, что трансфицированные клетки MLE-12 сохраняют жизнеспособность: после 48 ч роста уровень апоптических клеток в культуре не превышает 15%, так же, как и в исходных клетках (рис. 6).

Таким образом экспериментально продемонстрирована возможность экспрессии гена микробной РНКазы в эпителиальных клетках легких мыши. Вестерн-блот анализом с помощью анти-тус антител, в среде был детектирован иммунный комплекс с молекулярной массой 25 кДа, указывающий на обнаружение димерной формы биназы, поскольку именно РНКазы в составе вектора pCS2+ была мечена полипептидом тус (см. рис. 4). Возможность димеризации фермента была подтверждена методом зимографии, который выявил наличие двух зон гидролиза РНК, соответствующих ферменту с молекулярной массой 12

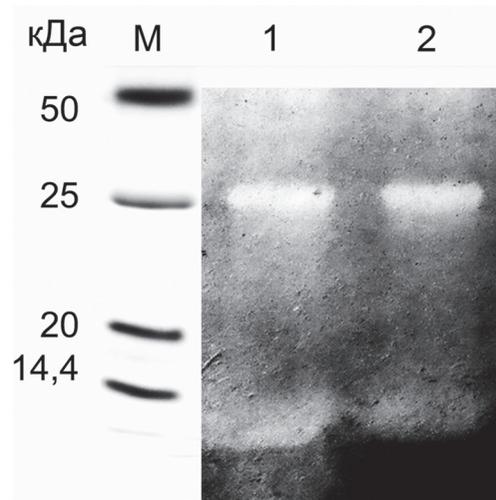


Рис. 5. Определение РНКазной активности в полиакриламидном геле методом зимографии: 1 – лиофилизированный препарат биназы; 2 – супернатант MLE-12; М – белковый маркер «PageRuler»

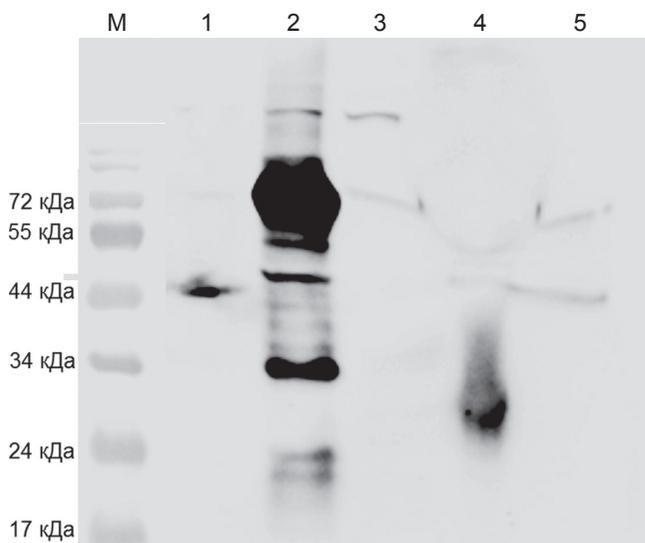


Рис. 4. Детекция биназы методом вестерн блотта с использованием анти тус-антител: 1 – вектор pCS2+ без вставки; 2 – векторная система, экспрессирующая флуоресцентный белок GFP-тус; 3 – клеточный лизат MLE-12; 4 – супернатант MLE-12; 5 – лиофилизированный препарат биназы; М – ДНК маркер

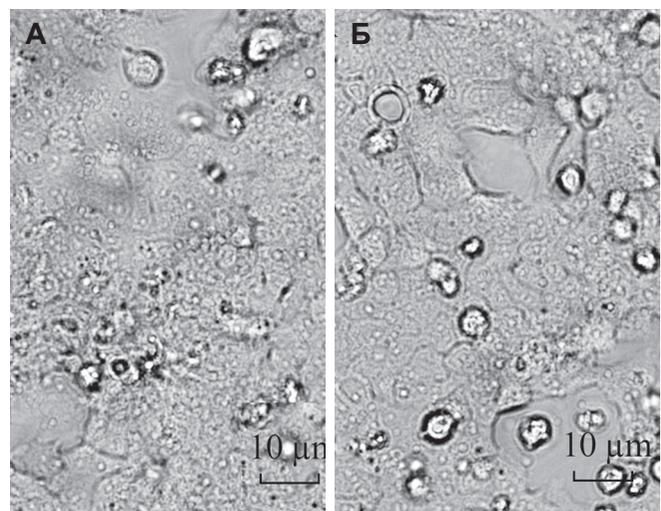


Рис. 6. Визуализация апоптических изменений популяции клеток MLE-12 спустя 48 ч роста после трансфекции (А) и без трансфекции (Б)

и 25 кДа (см. рис. 5). Таким образом, мы обнаружили также мономер биназы, обладающий каталитической активностью и описанный в ряде работ как классическая РНКазы *B. pumilus* [21].

В настоящее время способность к димеризации показана для многих РНКаз: панкреатической РНКазы А [22], рибонуклеазы семенников быка (BS-РНКазы) [23], РНКазы L [24] и других. Однако лишь одна из них, РНКазы семенников быка (BS-РНКазы) является природным димером [23]. Для биназы образование димеров обнаружено в кристаллах [18], однако, возможность димеризации фермента в растворе также не исключается [19].

Известно, что обработка клеток MLE-12 биназой в концентрации 100 нМ приводит к гибели 50% трансформированной клеточной популяции эпителия легких уже в первые 24 ч инкубации, возможно, расщепляя РНК в составе онкогена Tag и запуская апоптоз [14]. Также можно предположить, что биназа связывается с мембранными белками — участниками сигнальных путей, либо разрушает определенную доступную РНК в клетках, приводя в итоге к гибели клеток. Так, для *kit*-экспрессирующих клеток показано, что разрушение мРНК *kit*-онкогена — необходимый этап проявления дальнейших цитотоксических свойств фермента [12]. Однако, для клеток MLE-12 показано, что биназа в основном индуцирует их гибель практически без проникновения, через взаимодействие с поверхностными структурами [14]. Рассматривая трансфицированные клетки, необходимо помнить, что они защищены от цитотоксического действия секретируемой биназы барстаром, экспрессирующимся на трансфицирующей плазмиде рCS2+. Действительно, нами было показано, что клетки секретировали в среду биназу, однако оставались жизнеспособными (см. рис. 6).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 2010; 127: 2893–917.
2. Чиссов В.И., Александрова Л.М., Бутенко А.В. Научные основы и перспективы развития клинической онкологии. *Вестник Росздрава* 2010; 4: 68–71.
3. orchilin V.P. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 343–75.
4. Rawat A., Vaidya B., Khatir K. et al. Targeted intracellular delivery of therapeutics: an overview. *Pharmazie* 2007; 62(9): 643–58.
5. Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* 2005; 4(5): 512–7.
6. Vogelstein B., Kinzler K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* 2004; 10: 789–99.
7. Chirino A.J., Ary M.L., Marshall S.A. Minimizing the immunogenicity of protein therapeutics. *Drug Discovery Today* 2004; 9(2): 82–90.
8. Saxena S.K., Shogen K., Ardelt W. Onconase and its therapeutic potential. *Lab. Med.* 2003; 34: 380–7.
9. Porta C., Paglino C., Mutti L. Ranpirnase and its potential for the treatment of unresectable malignant mesothelioma. *Biologics* 2008; 2(4): 601–9.
10. Makarov A.A., Ilinskaya O.N. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Lett.* 2003; 540: 15–20.
11. Makarov A.A., Kolchinsky A., Ilinskaya O.N. Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. *Bioessays*. 2008; 30(8): 781–90.
12. Mitkevich V.A., Petrushanko I.Y., Spirin P.V. et al. Sensitivity of acute myeloid leukemia Kasumi-1 cells to binase toxic action depends on the expression of KIT and AML1-ETO oncogenes. *Cell Cycle* 2011; 10(23): 4090–97.
13. Зеленихин П.В., Черепнев Г.В., Керн Ф. и соавт. Биназа не индуцирует поликлональный Т-клеточный ответ. *Доклады академии наук* 2006; 407(3): 1–3.
14. Cabrera Fuentes H.A., Kalacheva N.V., Mukhametshina R.T. et al. Binase penetration into alveolar epithelial cells does not induce cell death. *Biomed. Khim.* 2012; 58: 272–80.

Сегодня в генотерапии наиболее эффективным методом доставки генетического материала считается трансдукция, при которой чужеродная ДНК упаковывается в вирусную частицу, а перенос генов осуществляется путем нормальной вирусной инфекции, обеспечивающей эффективность и селективность экспрессии гена [25]. Несмотря на основное преимущество вирусной доставки — высокой эффективности, этот способ остается малоизученным и небезопасным, ввиду высокой иммуногенности вирусных векторов, а также риска возникновения мутаций. Кроме того, вирусные частицы обладают малой емкостью, ограничивающей возможности генотерапии [5, 25]. Невирусные системы безопасны, но, возможно, менее перспективны ввиду низкой эффективности трансфекции *in vivo* [5]. Результаты данных экспериментов свидетельствуют о перспективности исследования новой экспрессионной системы на основе вектора рCS2+, поскольку введение полученной векторной конструкции в опухоли обеспечит экспрессию чужеродного белка в группе трансфицированных клеток, и соответственно, селективное цитотоксическое действие биназы на близлежащие нетрансфицированные опухолевые клетки, причем, сами клетки-продуценты будут защищены от токсического действия фермента внутриклеточным ингибитором — барстаром.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) Федерального Университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РНФ № 14-14-00522.

15. Znamenskaya L.V., Vershinina O.A., Vershinina V.I. et al. Expression of the genes for guanyl-specific ribonucleases from *Bacillus intermedius* and *Bacillus pumilus* is regulated by the two component signal transduction system PhoP-PhoR in *B. subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* 1999; 173: 217–22.
16. Sagar A.J., Pandit M.W. Denaturation studies on bovine pancreatic ribonuclease/ Effect of trichloroacetic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1983; 743: 303–9.
17. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–85.
18. Polyakov K.M., Lebedev A.A., Okorokov A.L. et al. The structure of substrate-free microbial ribonuclease binase and of its complexes with 3'-GMP and sulfate ions. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2002; 58: 744–50.
19. Mitkevich V.A., Schulga A.A., Trofimov A.A. et al. Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant. *Acta Cryst. D Biol. Crystallogr.* 2013; 69: 991–96.
20. Poliakov K.M., Goncharuk D.A., Trofimov A.A. et al. X-ray diffraction and biochemical studies of W34F mutant ribonuclease binase. *Mol. Biol. (Russia)* 2010; 44: 922–28.
21. Schulga A.A., Nurkiyanova K.M., Zakharyev V.M., et al. Cloning of the gene encoding RNase binase from *Bacillus intermedius* 7P. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 2375.
22. Arnold U., Leich F., Neumann P. et al. Crystal structure of RNase A tandem enzymes and their interaction with the cytosolic ribonuclease inhibitor. *FEBS J.* 2011; 278: 331–40.
23. Gotte G., Mahmoud Helmy A., Ercole C. et al. Double domain swapping in bovine seminal RNase: formation of distinct N- and C-swapped tetramers and multimers with increasing biological activities. *PLoS One* 2012; 7: e46804.
24. Garvie C.W., Vasanthavada K., Xiang Q. Mechanistic insights into RNase L through use of an MDMX-derived multi-functional protein domain. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1834: 1562–71.
25. Flotte T.R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther.* 2004; 11(10): 805–10.

Поступила: 12.08.2014