

УДК 612.1.577.617.96

© Коллектив авторов

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ЦИТОХРОМА P450 2B6 ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *ESHERICHIA COLI*

С.Н.КОЛОМЕЙЧУК^{1,2}, М.В.ПОКРОВСКАЯ¹, А.А.БОРИСОВА¹, А.А. ЖГУН³,
Л.И.СОЛОДАРЬ¹, Н.Н. СОКОЛОВ¹, В.И.ШВЕЦ², Ю.В.ГЕРВАЗИЕВ¹,
М.А.ЭЛЬДАРОВ³, А.И.АРЧАКОВ¹

¹НИИ биомедицинской химии им.В.Н. Ореховича РАМН, 119992 Москва,
Погодинская ул., 10;

Тел./факс (095) 246-33-75 / 245-08-57 Эл. почта: sokolov@ibmh.msk.su

²Московская академия тонкой химической технологии им. Ломоносова, 117571
Москва, пр. Вернадского, д.86. Тел. (095) 434-83-55

³Центр "Биоинженерия" РАН, 117984, Москва, Проспект 60-летия Октября,
д. 7/1, Тел./факс (095) 135-62-19 / 135-05-71

Осуществлено клонирование гена цитохрома P450 2B6 человека из плазмиды pUC9, несущей кДНК цитохрома, в эукариотический экспрессионный вектор pcDNA 3.1. Получены доказательства экспрессии гена цитохрома P450 2B6 в составе рекомбинантной плазмиды pcDNA 3.1/CYP 2B6 в клетках *E.coli*. Уровень экспрессии каталитически активного рекомбинантного белка составил 60-100 нмоль/л культуры. Данную генетическую конструкцию в сочетании с химиотерапией оксазафосфоринами (циклофосфамид и ифосфамид) предполагается использовать при разработке нового подхода к лечению злокачественных новообразований у человека.

Ключевые слова: цитохром P450 2B6, генотерапия, химиотерапия, гены самоубийства, клонирование генов, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ. Лечение онкологических заболеваний попрежнему остаётся одной из важнейших проблем, стоящих перед теоретической и практической медициной [1-4]. Как правило, традиционные методы лечения онкологических больных направлены на устранение последствий возникновения, а не причин, их вызывающих [5, 6]. Существенным недостатком терапии онкологических

заболеваний является ее низкая избирательность, сопряженная с многочисленными побочными эффектами. Все это наряду с возрастающей смертностью населения развитых стран от онкологических заболеваний создало предпосылки для возникновения альтернативных "биологических" стратегий терапии и лечения злокачественных опухолей [7,8]. Такой стратегией является генная терапия, главным инструментом которой является ген, выступающий в качестве средства для лечения моногенных заболеваний, опухолей и инфекций.

В последние несколько лет в литературе описано достаточно много генотерапевтических подходов к лечению злокачественных новообразований различной этиологии [9-11]. В генотерапии злокачественных новообразований можно выделить 4 основных направления: использование антисмысловых олигонуклеотидов и рибозимов, опухолевые "вакцины", введение генов-супрессоров опухолей, применение т. н. "генов самоубийства".

Среди вышеперечисленных подходов следует отметить введение в опухолевые клетки так называемых "генов самоубийства", кодирующих ферменты, которые активируют или превращают терапевтически инертные химические соединения в мощные цитотоксические агенты [1-10]. Этот принципиально новый двухэтапный подход к лечению опухолей, приводящий к мощному повышению чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам получил название **GDEPT (gene directed enzyme prodrug therapy)**.

К числу наиболее хорошо изученных и разрабатываемых в настоящее время ферментов, кодируемых "генами самоубийства", следует отнести тимидинкиназу вируса простого герпеса (*HSVtk*), цитозиндезаминазу, нитроредуктазу и пуринофосфорилазу *E. coli*, бактериальный фермент карбоксипептидазу G2 и ряд др. [11]. Было показано, что некоторые цитохромы семейства P450 осуществляют метаболическую активацию в клетках фармакологически и токсически инертных противоопухолевых препаратов циклофосфида (ЦФА) и его изомера ифосфида (ИФА) с образованием цитотоксических метаболитов 4-гидрокси-ЦФА и горчичного фосфорамида, алкилирующих соответственно ДНК и белки [12]. Прямое введение цитотоксических метаболитов оксазофосфоринов не оказывает существенного эффекта вследствие очень короткого времени полупериода их выведения (~15 - 30 мин.) [13]. Таким образом, локальная генотерапия цитохромами P450, сочетанная с системным введением ЦФА или ИФА, позволяет создать высокую концентрацию активных цитотоксических метаболитов в области локализации опухоли и уменьшить их общий токсический эффект на организм. Цитохромы P450, осуществляющие активацию ЦФА и ИФА, были идентифицированы в печени крысы [14, 15] и человека [16]. В печени взрослых крыс биотрансформацию ЦФА катализируют три формы цитохрома P450: индуцируемый фенобарбиталом цитохром P450 2B1 и конститутивно экспрессируемые цитохромы P450 2C6 и 2C11 [14]. Форма цитохрома P450 3A4 печени крыс активна при метаболизме ИФА [15]. В печени человека за биотрансформацию ЦФА и ИФА ответственны формы цитохрома P450 2B6 и 3A4 [16]. Среди цитохромов семейства P450 печени крыс наиболее активным в метаболизме оксазофосфорина является цитохром P450 2B1, в то время как в печени человека - форма 2B6 [17].

Цель настоящей работы состояла в создании генетической конструкции, несущей ген цитохрома печени человека P450 2B6, способной стабильно экспрессировать целевой белок в эукариотических клетках для последующего применения конструкции в генотерапевтических экспериментах. В рамках программы «Генотерапия социально значимых заболеваний человека» в дальнейшем планируется получение комплексов кДНК цитохрома P450 с катионными липосомами и тестирование их действия на линиях опухолевых клеток человека.

МЕТОДИКА. В работе использовали штаммы *E.coli*: JM109(DE3) - (*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17(rK-mK+) supE44 relA1 (DE3) Δ(lac proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]*)(Promega, США); XL1-Blue - (*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]*) (Life Technologies, Великобритания).

Плазмида pUC9 со вставкой кДНК цитохрома CYP450 2B6 была любезно предоставлена д-ром Ф.Дж. Гонзалесом (Национальные институты здоровья, Бетезда, США). Плазмида pсDNA3.1(+) производства фирмы «Invitrogen» (США). В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразу (фрагмент Кленова), ДНК-лигазу бактериофага T4, щелочную фосфатазу, λ /HindIII гидролизаты производства МБИ «Fermentas» (Литва). Постановку ферментативных реакций проводили в условиях, указанных фирмами-производителями соответствующих ферментов.

Получение компетентных клеток, трансфекцию, разделение фрагментов ДНК и их выделение из геля проводили по методикам, описанным в руководстве Sambrook et al. [18].

Плазмидную ДНК выделяли согласно методике Birnboim и Doly [19].

Электрофорез белков проводили в 12,5%-ном ПААГ с ДСН по методу Laemmly [20].

Изучение экспрессии CYP2B6. Ночную культуру выращивали из музея замороженных клеток в 5 мл LB-среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37° С и скорости перемешивания 160 об/мин. В колбы Эрленмейера объемом 500 мл с 50 мл ТВ-среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и набор микроэлементов [19], инокулировали 1:200 объема ночной культуры и инкубировали при 37°С и скорости перемешивания 160 об./мин. до достижения оптической плотности культуры A_{600} , равной 0,6–0,8 ОЕ. После этого проводили индукцию добавлением ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и вносили в среду глюкозу, глицин и δ -аминолевулиновую кислоту (конечная концентрация соответственно 0,2 г/мл, 0,02 г/мл и 0,5 мМ). Клетки инкубировали в течение 48 ч (28°С, 150 об/мин) [19].

Определение содержания CYP2B6 в мембранной фракции клеток *E.coli*. Для этого из 200 мл культуральной жидкости осаждали клетки центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин. Далее клетки ресуспендировали в калий-фосфатном буфере (10 мМ К-фосфат, pH 7,4; 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0; 20% глицерин, 0,3 М NaCl, 0,1 мМ дитиотреитол). Полученную суспензию гомогенизировали (гомогенизатор Поттера) в присутствии лизоцима (конечная концентрация 0,1 мг/мл) и инкубировали 30 мин при перемешивании. Эту и все последующие операции проводили при 4°С. Суспензию центрифугировали в течение 30 мин. при 5000 об/мин. Супернатант сливали,

осадок ресуспендировали в 10 мл HEPES, pH 7,4 (10 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 mM ЭДТА, pH 8,0, 20% глицерин, 0,3 M NaCl, 0,1 mM дитиотреитол) и добавляли фенилметил-сульфонилфторид до конечной концентрации 1 mM. Озвучивание суспензии проводили на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т (Россия) (22 кГц, 5×15 с при +2-4°C) до появления опалесценции красноватого оттенка. Далее суспензию центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант переносили в ультрацентрифужные пробирки и повторно центрифугировали (30 мин, 40000 об/мин на Beckman L8-80, ротор Ti 90). Супернатант сливали для измерения активности цитохрома P450. Полученный осадок ресуспендировали в 3 мл 10 mM HEPES pH 7,4, затем дробно добавляли эмульген 913 до конечной концентрации 0,5%. Раствор переносили в пробирки типа "Эппендорф" и центрифугировали (30 мин, 15000 об/мин). Содержание активного цитохрома P450 в полученных образцах определяли спектрофотометрически после восстановления дитионитом натрия и насыщения образца окисью углерода, рассчитывая уровень цитохрома, исходя из коэффициента молярного поглощения $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ по формуле, предложенной в работе [21]. Для регистрации дифференциальных спектров использовали спектрофотометр Hitachi 557 («Hitachi», Япония) в режиме автоматической коррекции базовой линии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В нашем распоряжении была кДНК цитохрома P450 2B6, встроенная по сайтам узнавания рестриктазы *EcoRI* в плазмиду pUC9. Структурная часть гена цитохрома P450 2B6 состоит из 3045 пар оснований (п.о.) [22] и в нуклеотидной последовательности кДНК имеется два сайта узнавания для рестриктазы *PstI* и по одному для эндонуклеаз рестрикции *SalI*, *EcoRI*, *HindIII*, и *SmaI*. (рис. 1).

Ориентацию кДНК в плазмиде pUC9 относительно полилинкерной последовательности определяли по размерам фрагментов ДНК, образующихся при гидролизе плазмидной ДНК рестриктазами *HindIII*, *SmaI* и *PstI*. Результаты рестриктазного картирования, сопоставленные с теоретически рассчитанными размерами фрагментов, указывали на прямую ориентацию кДНК в векторе для клонирования.

Получение кДНК цитохрома P450 2B6 из рекомбинантной плазмиды. Для выделения кДНК цитохрома P450 2B6 из плазмиды pUC9/CYP 2B6 можно было провести гидролиз рестриктазой *EcoRI*, по сайту которой данный ген был встроен в эту плазмиду. Однако такой подход оказался невозможным в связи с наличием *EcoRI*-сайта в структурной области гена в районе 849-854 п.о. С другой стороны, выделение гена из плазмиды можно было бы осуществить с помощью ее гидролиза по сайтам узнавания двух различных ферментов рестрикции: *EcoRI* и какой-либо рестриктазы из структуры полилинкера. Но и такой подход представлялся нам маловероятным, учитывая то обстоятельство, что участки узнавания рестриктаз в полилинкере плазмиды pUC9/CYP 2B6 и экспрессионной плазмиды pCDNA 3.1 (+), в которую предполагалось встроить ген цитохрома P450 2B6, имеют мало перекрывающихся сайтов рестрикции. В результате нами была выбрана следующая схема выделения гена цитохрома P450 2B6 из рекомбинантной плазмиды pUC9/CYP 2B6:

- Получение промежуточной конструкции pUC9/ Δ *SmaI* CYP 2B6.

Частичное расщепление плазмиды pUC9/ Δ *SmaI* CYP 2B6 рестриктазой *EcoRI* с последующим гидролизом полученного продукта по сайту *SmaI*.

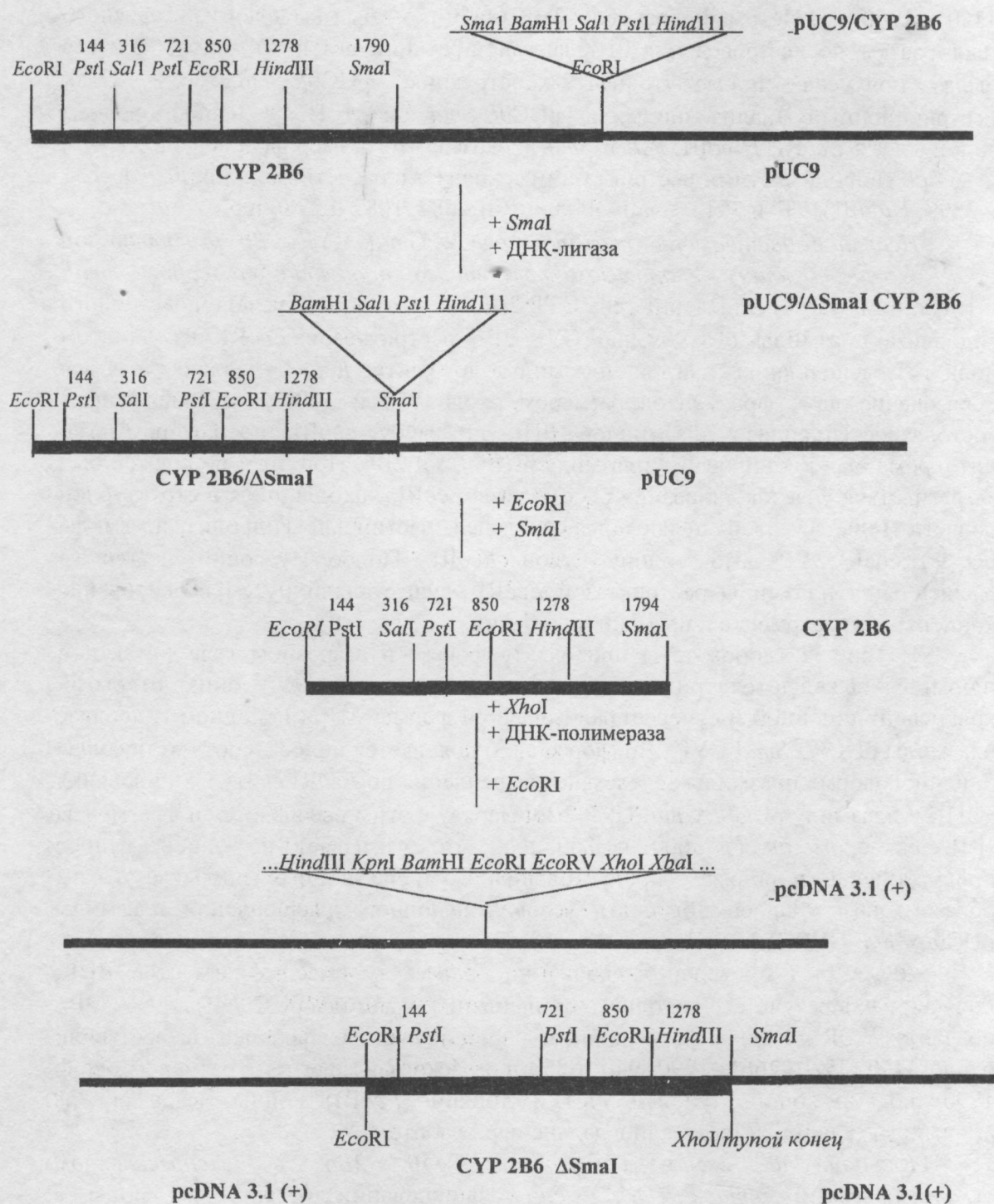


Рисунок 1.

Схема клонирования гена цитохрома P450 2B6 в экспрессионный вектор pcDNA 3.1(+)

Получение промежуточной конструкции pUC9/ΔSmaI CYP 2B6. Для получения фрагмента рекомбинантной плазмиды pUC9/CYP 2B6, содержащей структурную часть гена цитохрома, плазмиду гидролизуют рестриктазой *SmaI*.

При этом происходило образование двух фрагментов ДНК с размерами около 4450 и 1260 п.о. Искомый фрагмент ДНК (4450 п.о.) был выделен из агарозного геля и затем, после проведения ДНК-лигазной реакции замкнут в кольцо. В итоге была получена промежуточная конструкция pUC9/ Δ Sma CYP 2B6. Рестрикционный анализ плазмиды pUC9/ Δ Sma CYP 2B6 с использованием эндонуклеаз: *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* и *SmaI* показал, что размер фрагментов ДНК (в п.о.) при гидролизе этими рестриктазами совпадает с расчетными: для *EcoRI* - 851 и 3599; *HindIII* - 537 и 3913; *SmaI* - 4450 и *PstI* - 582, 1082 и 2786 п.о.

Неполное расщепление плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 рестриктазой EcoRI с последующим гидролизом полученного продукта по сайту SmaI. Следующим этапом выделения гена CYP 2B6 была отработка условий частичного гидролиза плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 рестриктазой *EcoRI*. Результатом полного расщепления данной плазмиды по сайту *EcoRI* должно являться образование двух фрагментов размером около 850 и 3600 п.о. Наша задача состояла в гидролизе плазмидной ДНК по сайту *EcoRI*, по которому ген цитохрома был клонирован в плазмиду pUC9/CYP 2B6. При этом не должен был затрагиваться участок узнавания рестриктазы *EcoRI*, находящийся в структурной области гена. С этой целью был проведен частичный гидролиз плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 эндонуклеазой *EcoRI*. Подбор условий неполного расщепления плазмиды рестриктазой *EcoRI* осуществляли путем варьирования концентрации фермента и времени инкубации.

На рис. 2 (дорожка 2) при электрофорезе в агарозном геле интактной плазмиды выявляются три полосы, соответствующие (сверху вниз) открытой кольцевой, линейной и суперспирализованной формам. При неполном гидролизе плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 (дорожка 3) появляется полоса, соответствующая линейной форме плазмиды вследствие расщепления по *EcoRI* сайту клонирования кДНК в плазмиду pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6. Наряду с этим выявляются и фрагменты ДНК размером около 3600 и 850 п.о., что указывает на одновременное присутствие в гидролизате продуктов полного и частичного гидролиза. Таким образом, нам удалось подобрать условия неполного расщепления плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6.

Далее был проведен гидролиз по *SmaI*-сайту смеси фрагментов ДНК, полученных в результате неполного расщепления плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 по сайту *EcoRI*. Расчетные величины длин полученных фрагментов составили около 4450, 3520, 2665, 1790, 940 и 850 п.о. Искомый фрагмент размером около 1790 п.о., имеющий тупой (*SmaI*) и липкий (*EcoRI*) концы, выделяли из агарозного геля и использовали в дальнейшей работе.

Клонирование гена цитохрома P450 2B6 в экспрессионном эукариотическом векторе pcDNA 3.1. (+). На основании литературных данных в качестве вектора для экспрессии нами была выбрана плазмида pcDNA 3.1 (+). Данная плазмида содержит элементы, позволяющие осуществлять экспрессию желаемого гена как в про - (ген устойчивости к ампициллину, что необходимо для селекции клонов в клетках *E.coli*, а также промотор фага T7), так и в эукариотических системах (ген устойчивости к неомицину/G418, CMV и SV40 промоторы) и полилинкерную последовательность для 16 рестриктаз, необходимую для клонирования. Ранее эта плазмида была успешно использована Lohr и соавторами для трансфекции гена цитохрома P450 2B1 в клетки почки

человека, инкапсулированные в микрочастицы из фосфата целлюлозы, и последующего введения генетически модифицированных клеток мышам в подкожно трансплантированную аденокарциному поджелудочной железы [23].

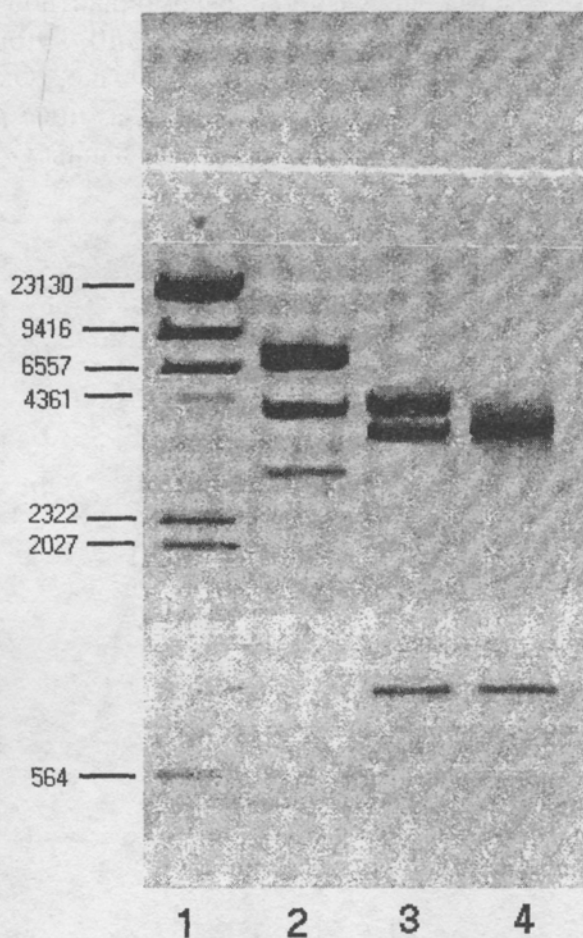


Рисунок 2.

Электрофорез в 0,7 %-ном агарозном геле фрагментов плазмиды pUC9/CYP P450 2B6, полученных после гидролиза по сайту *EcoRI*. 2 – исходная плазида pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6; 3 и 4 соответственно неполное и полное расщепление плазмиды pUC9/ Δ SmaI CYP 2B6 рестриктазой *EcoRI*; 1 - λ ДНК + *HindIII*. Слева указаны размеры маркерных фрагментов (в п.о.).

Плазмиду pcDNA 3.1 (+) расщепляли рестриктазой *XhoI* и липкий конец достраивали до тупого с помощью ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова). Далее проводили рестрикцию по сайту *EcoRI*. В результате была получена линейная форма плазмиды pcDNA 3.1 (+) с тупым и липким концами, необходимая для клонирования гена CYP 2B6.

Фрагмент ДНК размером около 1790 п.о., вырезанный из плазмиды pUC9 и содержащий ген CYP 2B6, лигировали с экспрессионным вектором pcDNA3.1(+), приготовленным как описано выше. Клетки *E. coli* XL-1 blue трансформировали лигазной смесью, предварительно обработанной рестриктазой *EcoRV* для удаления штамма дикого типа. Клетки высевали на чашки со средой LB, содержащей соответствующие антибиотики, и инкубировали в течение ночи при

37°C. Затем единичные колонии с твердой среды переносили в жидкую среду LB и выращивали в течение 16-18 ч. Рекombинантную плазмиду pcDNA 3.1/CYP 2B6 выделяли из клеток и проверяли наличие фрагмента в исходной плазмиде, используя в качестве контроля нативную плазмиду pcDNA3.1 (+). Для рестрикционного анализа полученной рекомбинантной плазмиды pcDNA3.1 (+)/CYP P450 2B6 была выбрана рестриктаза *Hind*III, которая должна расщеплять ее на два фрагмента размером 1307 и 5859 п.о. Оказалось, что размеры фрагментов ДНК, полученных при гидролизе плазмиды pcDNA3.1 (+)/CYP 2B6 эндонуклеазой *Hind*III, соответствуют расчетным данным.

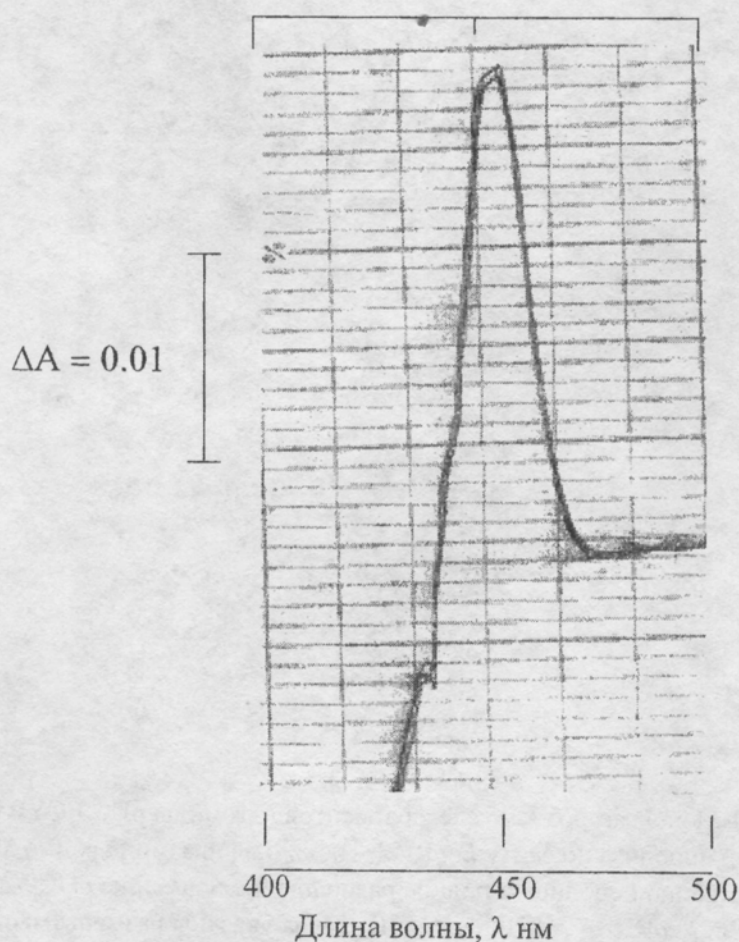


Рисунок 3.

Дифференциальный спектр поглощения мембранной фракции клеток *E.coli* JM109, трансформированных плазмидой pcDNA3.1/CYP 2B6.

Экспрессия цитохрома 2B6 в бактериальных клетках. Для оценки способности полученной рекомбинантной плазмиды pcDNA3.1 (+)/CYP 2B6 экспрессировать цитохром P450 2B6 клетки *E.coli* JM109, трансформированные этой плазмидой, выращивали на среде ТВ, как описано в разделе "Методика". С целью стимуляции синтеза цитохрома в среду добавляли предшественник гема - δ-аминолевулиновую кислоту. О синтезе P450 2B6 судили по наличию дифференциальных спектров поглощения.

Как видно из рис. 3, через 48 ч. инкубации в спектрах клеток *E.coli*, трансформированных плазмидой pcDNA3.1(+)/CYP 2B6, наблюдается полоса поглощения при 450 нмоль. Уровень экспрессии цитохрома P450 2B6 в клетках *E.coli* составил около 60-100 нм P450/л культуральной среды.

Об экспрессии цитохрома P450 2B6 в бактериальных клетках свидетельствуют также и результаты электрофореза в ПААГ/SDS лизатов из клеток *E.coli*, трансформированных рекомбинантной плазмидой. Как следует из рис 4, в лизатах из клеток, несущих плазмиду pcDNA3.1(+)/CYP 2B6, обнаруживается полоса, соответствующая по мол.массе цитохрому P450 2B6 (~ 56 кДа). В то же время в исходных (не трансфицированных) клетках такая полоса не выявляется.

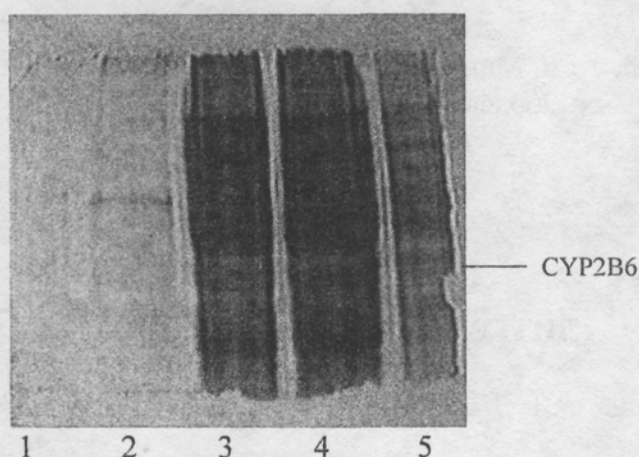


Рисунок 4.

Электрофорез в 12,5% ПААГ лизатов клеток *E.coli* штамма JM109 (DE3).
Обозначения: 1 – CYP2B1 (контроль); 2 – CYP 2B4 (контроль), 3 - клеточные лизаты, содержащие интактную плазмиду pc DNA3.1(+), 4 – клеточные лизаты, содержащие плазмиду pcDNA 3.1(+)/CYP 2B6; 5 – мембранная фракция клеток, содержащая плазмиду pcDNA 3.1(+)/CYP 2B6

Вследствие низкой экспрессии рекомбинантного белка его детекция в клеточных лизатах с помощью электрофореза в ПААГ была затруднена. Поэтому мы выделяли мембранную фракцию клеток *E.coli* штамма JM109 (DE3), обогащенную целевым белком.

Таким образом, на основании данных определения дифференциальных спектров поглощения цитохрома P450 и результатов электрофоретического анализа бактериальных клеток, трансфицированных рекомбинантной плазмидой pcDNA3.1/CYP2B6, можно считать, что нами получена генетическая конструкция, пригодная для последующего изучения возможности ее использования в разработке подходов к комбинированной химио/генотерапии опухолей.

Подводя итог проделанной работе и ее перспективам, важно отметить, что в опытах на культурах клеток и лабораторных животных при разработке способа сочетанной химио/генотерапии глиом, глиосарком [12,24] и аденокарциномы поджелудочной железы [23] авторы использовали изоформу 2B1 печени крысы как обладающую наиболее высокой биотрансформирующей активностью в отношении циклофосамида и ифосфамида. В нашей работе при создании

конструкции экспрессии цитохрома P450 мы взяли изоформу 2B6 печени человека, также высокоактивной в плане биотрансформации оксазофосфоринов. При этом мы исходили из нежелательности возникновения иммунных реакций при экспрессии цитохрома 2B1 крысы в организме человека, учитывая перспективу использования разрабатываемого подхода в клинике.

Кроме того, в отличие от известных в этом направлении работ мы предполагаем осуществить локальную доставку гена P450 2B6 в опухолевые клетки в составе катионных липосом, а не вирусных векторов. Для формирования катионных липосом будут использованы липиды с простой эфирной связью (алкильные липиды), обладающие способностью селективно накапливаться в опухолевых клетках, что создает предпосылки для адресной доставки в них генетической конструкции.

Работа поддержана грантом Миннауки, Проект 05 "Генодиагностика и генотерапия социально значимых заболеваний человека".

ЛИТЕРАТУРА

1. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. (1998). Мол. биол., **32**, 219-228.
2. Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 3539-3543.
3. Rosenberg S.A. (1992) J.Clin.Oncol., **10**., 180-199.
4. Rosenberg S.A., Spiess P., Lafreniere R. (1986). Science, **223**, 1318-1321.
5. Griffith K.D., Read E.L., Carrasquillo J.A. et al., (1989). J.Natl.Cancer Inst. **81**, 1709-1717.
6. Alama A., Barbieri F., Cagnoli M., Schettini G. (1997) Pharmacol. Res., **36**, 171-178.
7. Freeman S.M., Ramesh R., Matrogi A.J. et al. (1994). Cancer Gene Ther., **1**., 326-332.
8. Freeman S.M., Whartenby K.A., Freeman J.L. et al. (1996). Seminars in Oncology **23**, 21-45.
9. Israel M.A. (1993). Adv. Cancer Res., **61**, 57-85.
10. Connors T.A. (1995). Gene Ther., **2**, 702-709.
11. Соколов Н.Н., Александрова С.С., Омелянюк Н.М., Кирсанова И.Д., Чупырина И.В., Солодарь Л.И., Арчаков А.И. (1999) Вопр. мед. химии, **45**, 24-29.
12. Chen L., Waxman D.J. (1995) Cancer Res., **55**, 581-589.
13. Sladek N.E., Powers J.F., Grage G.M. (1984). Drug Metabol.Dispos., **12**, 553-559.
14. Clark L., Waxman D.J. (1989). Cancer Res., **49**, 2344-2350.
15. Weber G.F., Waxman D.J. (1993). Biochem.Pharmacol., **45**, 1685-1694.

16. Chang T.K., Weber G.F., Crespi C.L., Waxman D.J. (1993). *Cancer Res.*, **53**, 5629-5637.
17. Code E.L., Crespi C.L., Penman B.W. et al. (1997). *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 985-993.
18. Sambrook J.F., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
19. Birnboim H.C., Doly J. (1979) *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.
20. Laemmli U.K. (1970). *Nature (London)*, **227**, 680-685.
21. Omura T., Sato R. (1967). *Meth. Enzymol.*, **10**, 556-561.
22. Yamano S., Nhamburo P.T., Aoyama T., Meyer C.A., Inaba T., Kalow W., Gelboin H.V., McBride J.W., Gonzalez F.J. (1989) *Biochemistry* **28**, 7340-7348.
23. Lohr M., Muller P., Karle P. et al. (1998). *Gene Therapy*. **5**, 1070-1078.
24. Wei M.X., Tamiya T., Chaase M. et al. (1994) *Hum. Gene Ther.*, **5**, 969-978.

Поступила 20.09.01.

CLONING OF THE HUMAN CYTOCHROME P 450 2B6 GENE IN ESCHERICHIA COLI CELLS

S.N.KOLOMEICHUK^{1,2}, M.V.POKROVSKAYA¹, A.A.BORISOVA¹, A.A.JGOUN,
L.I.SOLODAR¹, N.N.SOKOLOV¹, V.I.SHVETS², Yu.V.GERVAZIEV¹, M.A.ELDAROV³,
A.I.ARCHAKOV¹

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow 119992:

tel/fax: (095) 246-33-80/(095) 245-08-57

Lomonosov Moscow Academy of Fine Chemical Technology, Vernadskogo prosp. 86, Moscow

117571; tel: (095) 434-83-55

Centre "Bioengineering" RAN, Prospect 60-letya October 7/1 Moscow 117571

tel/fax: (095) 135-62-19/(095) 135-05-07

Human cytochrome P450 2B6 gene from plasmid pUC9, carrying cytochrome CYP2B6 cDNA was cloned into eucariotic expression vector pcDNA 3.1 (+). Cytochrome P450 2B6 gene in recombinant plasmid pcDNA 3.1 (+) /CYP 2B6 was expressed in *E.coli* cells. The expression of catalytically active recombinant protein was 60-100 nm per liter of the culture medium.

Key words: cytochrome P450 2B6, gene therapy, chemotherapy, suicide genes, cloning of genes, gene expression.