

УДК 576.385+576.6+576.33

**ВЛИЯНИЕ ДЕЛЬТА-ЭНДОТОКСИНА
Bacillus thuringiensis subsp. sotto 617 НА ПРОЦЕСС
ГЛИКОЛИЗА В КЛЕТКАХ КУЛЬТУРЫ HeLa**

Д.В. Каменек, А.И. Колтаков, Л.К. Каменек

Аннотация

В работе представлено действие дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. sotto 617 на процесс гликолиза в клетках культуры рака шейки матки человека HeLa. Установлена интенсификация процесса гликолиза по аэробному механизму с образованием 3-фосфоглицерата и активированием 3-фосфоглицератдегидрогеназы в первые 10 мин действия дельта-эндотоксина. Зафиксировано возрастание активности лактатдегидрогеназы в клетках HeLa in vitro в период времени от 15 до 30 мин, то есть в условиях наблюдаемого уменьшения потребления кислорода. Начальное стимулирование дыхания в первые 10–15 мин инкубации с токсином приводит к ускорению катаболизма глюкозы с образованием пирувата и 3-фосфоглицерата и, как следствие, субстратов дыхательной цепи. Наблюдавшееся во всех случаях после 30 мин действия дельта-эндотоксина снижение активности внутриклеточной лактатдегидрогеназы отражает выход фермента из клеток в результате нарушения целостности их мембран.

Ключевые слова: дельта-эндотоксин, *Bacillus thuringiensis*, культура раковых клеток, 3-фосфоглицератдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, гликолиз, клеточное дыхание.

Введение

Спорообразующую кристаллофорную бактерию *Bacillus thuringiensis* до недавнего времени рассматривали исключительно как энтомопатогенный микроорганизм, использующийся при получении инсектицидных препаратов для защиты растений. *B. thuringiensis* осуществляет генетически детерминированный синтез дельта-эндотоксина (ДЭТ), для которого в последние годы, помимо инсектицидного действия, установлена цитотоксическая активность в отношении некоторых бактерий, фитопатогенных грибов и опухолевых клеток [1–3]. Показано, что строение и химические свойства ДЭТ разного происхождения имеют значительное сходство [4]. Механизм действия ДЭТ состоит в том, что он способен связываться с рецепторными областями на цитоплазматических мембранах, формируя каналы-поры, приводящие к нарушению активного транспорта ионов через мембрану [5]. В митохондриях чувствительных к нему клеток ДЭТ вызывает разобщение окислительного фосфорилирования и дыхания, обусловленное его протонофорными свойствами. Способность разобщать при этом не зависит от источника происхождения токсина в пределах патотипа, но прямо пропорциональна его концентрации [6]. Разобщение приводит к снижению продукции аденозинтрифосфата (АТФ), то есть деэнергизации клеток и, как следствие, нарушению энергоемких процессов, таких как синтез белка, активный

транспорт и др. Характерная для разобщения активация дыхания в начальный период сменяется нарастающим во времени снижением его уровня, что обуславливает усиление анаэробности. Изменяющийся характер потребления кислорода неизбежно должен отражаться на особенностях протекания гликолиза.

В литературе практически отсутствуют сведения, касающиеся механизма действия ДЭТ на раковые клетки. В связи с вышеизложенным целью настоящей работы стала характеристика действия дельта-эндотоксина *B. thuringiensis* subsp. sotto 617 на процесс гликолиза в клетках культуры рака шейки матки человека HeLa.

1. Постановка задачи

В работе использовали штамм 617 подвида *B. thuringiensis* subsp. sotto, полученный из ФГУП ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов (г. Пушкино). Данный подвид продуцирует ДЭТ, токсичный для чешуекрылых (патотип А) и кодируемый генами класса Cry I [7]. Поверхностное культивирование осуществляли в термостатах при 27 °С в чашках Петри на агаризованной питательной среде РПА, pH 7.2–7.5. Биомассу *B. thuringiensis*, содержащую кристаллы эндотоксинов и споры продуцента, отмывали дистиллированной водой от компонентов питательной среды и водорастворимых токсинов. Кристаллы предварительно выделяли в чистом виде, используя двухфазную систему: 1%-ный водный раствор $\text{Na}_2\text{SO}_4 : \text{CCl}_4$ [8]. При этом кристаллы переходили в водную фазу, из которой их осаждали центрифугированием. Щелочную экстракцию ДЭТ выполняли по методу Кукси [9]. Затем раствор подвергали диализу и доводили водой до необходимой концентрации. pH раствора снижали до 7.8 титрованием 0.1 н HCl. Разделение токсичных полипептидов проводили методом хроматографии на колонке Sephadex-G-200 размерами 2.54 см × 10 см, собирая фракции с молекулярной массой выше 60 кДа, которые составили не менее 90% от общей массы белка. Соответствие полученных экстрактов эндотоксинам подтверждали электрофоретически с использованием следующих маркерных белков: бычий сывороточный иммуноглобулин G (150 кДа), трансферрин (80–90 кДа), альбумин (67 кДа), цитохром с (13.37 кДа). Очистку ДЭТ завершали микрофильтрацией через бактериальные фильтры (диаметр пор 0.4 мкм), которая являлась одновременно и стерилизацией. В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы ДЭТ [10]. Концентрацию белка определяли по Лоури [11].

Культуру клеток HeLa выращивали на питательной среде Грейса с добавлением телячьей сыворотки при pH 7.2 [12]. Титр культуры составлял 1 млн клеток на 1 мл суспензии.

Для определения активности дегидрогеназ клетки растирали в жидком азоте и экстрагировали при –4 °С в течение 30 мин в 5 мл 0.1 М фосфатного буфера, pH 7.3, для получения экстракта, содержащего лактатдегидрогеназу (ЛДГ), и в 5 мл 0.1 М карбонатного буфера, pH 9.8, для получения экстракта, содержащего 3-фосфоглицератдегидрогеназу (ФГДГ) [12]. Полученные экстракты центрифугировали при 16000 об/мин при температуре от 0 °С в течение 30 мин на центрифуге марки К-23 (Германия).

Инкубационная смесь для определения активности ЛДГ содержала в конечном объеме 3 мл: 1.2 мг пирувата; 0.5 мг NADH; 30 mM NaOH; 3 mM фосфатного буфера, pH 7.3, и экстракт фермента, содержащий около 1 мг белка. Инкубационная смесь для выявления активности ФГДГ содержала в конечном объеме 3 мл: 0.4 мг натриевой соли 3-фосфоглицерата; 5.5 мг NAD⁺; 3 mM карбонатного буфера, pH 9.8, и экстракт фермента, содержащий около 1 мг белка.

Инкубационную смесь после внесения ферментного препарата перемешивали, термостатировали в кювете и измеряли начальную оптическую плотность (E_1) при 340 нм. После инкубации в течение 10 мин при 25 °C вновь измеряли оптическую плотность (E_2). Контрольная кювета содержала только соответствующий буфер и ферментный препарат. Реакцию останавливали погружением проб в лёд и добавлением 2 мл 20%-ного раствора ТХУ. В контрольные пробы, содержащие все компоненты, ТХУ добавляли перед суспензией клеток. Активность дегидрогеназ выражали числом микромолей (мМ) NADH, израсходованного или возникшего в течение 1 мин при 25 °C и 1 мг белка ферментного экстракта (мМ NADH·мин⁻¹· мг⁻¹ белка). Расчет проводили по формуле

$$A = 10 \cdot E / (1.95 \cdot C),$$

где A – удельная активность фермента; E – разность E_1 и E_2 ($E_1 - E_2$ – для ЛДГ и $E_2 - E_1$ – для ФГДГ); C – количества белка в ферментном препарате.

Поглощение кислорода изучали микроанометрическим методом в аппарате Баркрофта по изменению давления газа в замкнутом пространстве [13] и выражали в процентах от контрольного уровня поглощения суспензией клеток без добавления токсина. Среда для изучения интенсивности дыхания содержала в конечном объеме 3 мл: 1 мл суспензии клеток; 0.1 мл раствора гексокиназы (20 Е/мл) в 2%-ной глюкозе; 0.1 мл 1 М глюкозы и 0.1 мл раствора, содержащего 0.3 mM MgCl₂; 0.3 mM ЭДТА; 1 mM сукцината; 10 мкМ Na-ортофосфат-HCl-буфера, pH 7.4.

Математическую обработку результатов, полученных из трехкратных повторностей каждого эксперимента, проводили стандартными методами в программе Microsoft Excel 2007. Достоверность различий групп данных оценивали с помощью критерия Крамера – Уэлча. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$. На рисунках и в таблице представлены среднеарифметические значения и доверительный интервал измерений.

2. Результаты и их обсуждение

Катаболизм глюкозы в цитоплазме клетки не только сопровождается синтезом некоторого количества АТФ, но в аэробных условиях в основном является поставщиком предшественников субстратов дыхательной цепи, легко проникающих в митохондрии. Повышение потребления кислорода клеткой приводит к увеличению потребности митохондрии в восстановительных эквивалентах, используемых в дыхательной цепи. В связи с этим должно произойти ускорение гликолиза в цитозоле.

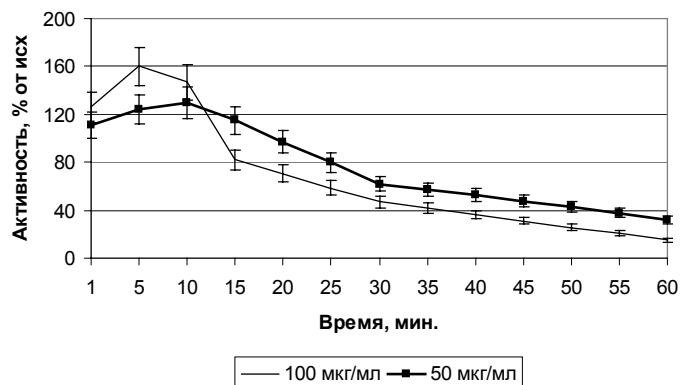


Рис. 1. Изменение активности 3-фосфоглицератдегидрогеназы в цитозоле клеток *in vitro* под действием дельта-эндотоксина в концентрации 100 и 50 мкг/мл

Однако поскольку под воздействием ДЭТ *B. thuringiensis* процессы дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях разобщены, прекращается и синтез АТФ. Развивающаяся деэнергизация клетки приводит к торможению работы дыхательной цепи и снижению потребности в субстратах — продуктах гликолиза. В результате прекращается приток в митохондрии метаболитов глюкозы. Вероятно, вследствие дальнейшего снижения дыхательной активности гликолиз переключается на анаэробный режим, приводя к повышению активности ЛДГ и уровня концентрации лактата в цитозоле.

При изучении влияния ДЭТ на интенсивность гликолиза удобными моделями оказались ФГДГ, активность которой тем выше, чем выше степень аэробности условий, и ЛДГ, для которой характерно обратное.

Анализ изменения активности ФГДГ в цитозоле клеток под воздействием двух концентраций ДЭТ (рис. 1) показал, что в течение первых 10 мин его действия активность ФГДГ превышала уровень таковой в интактных клетках (норма). При концентрации токсина 100 мкг/мл активация (на 25%) начиналась уже через 1 мин и достигала максимума (60%) через 5 мин. Через 10 мин активность фермента оставалась высокой и составляла 46% от нормы. Затем отмечали снижение активности: через 15 мин до 80%, а через 60 мин до 15% от исходной.

Для концентрации 50 мкг/мл ДЭТ активация была менее значительной, ее максимум (32%) отмечали через 10 мин. Более медленно происходило и снижение активности, устанавливаясь через 60 мин на уровне 33% исходной.

Приведенные данные согласуются с представленными в табл. 1, демонстрирующими динамику изменения потребления кислорода клетками под действием тех же концентраций ДЭТ.

Сопоставление этих результатов показывает, что начальное стимулирование дыхания (в первые 10–15 мин инкубации с токсином) приводит к ускорению катаболизма глюкозы с образованием пирувата и 3-фосфоглицерата, и как следствие, субстратов дыхательной цепи.

Однако в периоды времени более 10 мин для концентрации ДЭТ 100 мкг/мл и 15 мин для 50 мкг/мл происходит снижение интенсивности дыхания, и вслед за этим угнетается гликолиз. Фактически в течение 60 мин происходит затухание

Табл. 1

Влияние дельта-эндотоксина на потребление кислорода клетками HeLa

Концентрация токсина, мкг/мл	Эффект	1 мин	5 мин	10 мин	15 мин	30 мин	60 мин	Норма (в отсутствие токсина)
100	Потребление O ₂	2.28 ± 0.26***	1.88 ± 0.25	1.60 ± 0.08	1.20 ± 0.16***	0.40 ± 0.09***	0.06 ± 0.02***	1.70 ± 0.27
50	Потребление O ₂	1.69 ± 0.08	1.88 ± 0.19	1.80 ± 0.21	1.40 ± 0.15	1.10 ± 0.26	0.82 ± 0.12**	1.70 ± 0.27

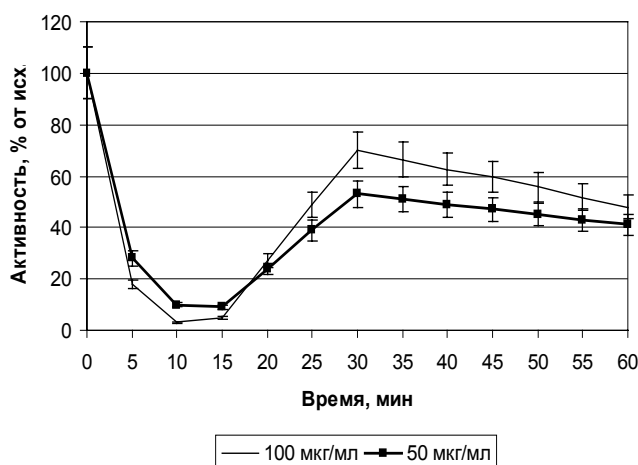
** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

Рис. 2. Изменение активности лактатдегидрогеназы в клетках HeLa в результате действия in vitro дельта-эндотоксина

процесса. Это связано не только с практически полным прекращением синтеза АТФ в митохондриях, но и с тем, что к этому времени происходит интенсивное разрушение клеток с освобождением их содержимого в культуральную среду, тем не менее часть клеток остается неразрушенной.

Очевидно, что в анаэробных условиях клетки переключаются на преимущественное образование в ходе гликолиза лактата. Для проверки этого предположения были проведены измерения активности ЛДГ в клетках.

Было зафиксировано возрастание активности ЛДГ в клетках HeLa in vitro (рис. 2) в период времени от 15 до 30 мин, то есть в условиях наблюдаемого уменьшения потребления кислорода. Через 5–15 мин, напротив, отмечено практическое отсутствие активности ЛДГ. Это объясняется подавлением образования лактата в условиях повышенной аэробности. В период времени после 15 мин, когда резко снижается поглощение кислорода, гликолиз переключается на анаэробный режим с образованием лактата, о чем свидетельствует увеличение активности ЛДГ.

Дополнительной интерпретации требуют данные по снижению активности ЛДГ, наблюдавшемуся во всех случаях после 30 мин действия ДЭТ на клетки. Известно, что при любом нарушении целостности мембран осуществляется

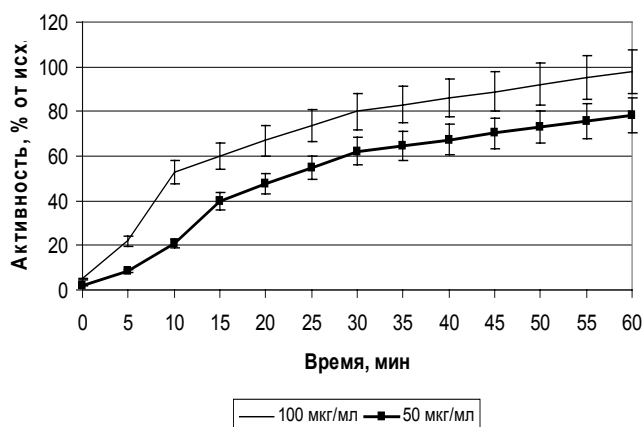


Рис. 3. Изменение активности лактатдегидрогеназы в супернатанте в результате действия дельта-эндотоксина на клетки HeLa *in vitro*. За 100% принята суммарная активность ЛДГ в клетках и супернатанте

выход ЛДГ в окружающую среду [14]. Следовательно, еще в визуально целостных клетках в их мембранах возникают повреждения, способствующие выходу водорастворимых молекул ЛДГ в культуральную среду.

Эберсолд и соавторы [15] обнаружили при действии 10 мкг/мл ДЭТ *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* на культуру клеток *Choristoneura futiferana* выход ЛДГ во внеклеточную среду, достигавший через 60 мин инкубации 80% от внутриклеточной активности.

Нами регистрировалась активность ЛДГ в супернатантах, полученных при отделении культуры клеток путем центрифугирования через разные промежутки времени действия токсина. Полный выход ЛДГ в культуральную среду при инкубации культуры клеток с ДЭТ регистрировался уже спустя 5 мин после начала инкубации (рис. 3). При этом активность фермента была выше при концентрации токсина 100 мкг/мл (21% общей активности) по сравнению с 50 мкг/мл (8%). Далее активность ЛДГ возрастала практически линейно при обеих концентрациях и достигала 100% (100 мкг/мл) и 79% (50 мкг/мл) через 60 мин инкубации.

Таким образом, усиление клеточного дыхания приводит к ускорению процесса гликолиза в клетках HeLa в течение всего периода усиленного дыхания (1–15 мин). Это связано с возросшими потребностями митохондрий в субстратах дыхательной цепи. Синтез АТФ в то же время значительно снижается в результате разобщения, что приводит к деэнергизации клетки и последующему снижению интенсивности дыхания. Далее, как следует из представленных выше данных, происходит переключение гликолиза преимущественно на анаэробный механизм с образованием лактата и активированием ЛДГ (через 10 мин инкубации). В тот же период появляются нарушения проницаемости цитоплазматической мембраны, которые проявляются в наибольшей степени после 15 мин инкубации. Результатом этого является нарастающий во времени и зависящий от концентрации токсина выход ЛДГ во внеклеточную среду.

Отметим, что определение уровня ЛДГ в культуральной жидкости клеток является известным тестом на повреждение клеток и может использоваться для выявления токсичности ДЭТ.

В заключение отметим, что ДЭТ *B. thuringiensis* оказывает влияние на характер и особенности гликолиза в клетках HeLa, связанное со способностью токсина разобщать процессы дыхания и окислительного фосфорилирования. Характерной является активация ФГДГ, пропорциональная концентрации ДЭТ в течение первых 10–15 мин действия токсина, и практически полная инактивация фермента через 30 мин, отражающая прекращение окислительного синтеза АТФ в митохондриях в результате разобщающего влияния ДЭТ. Нарастающие в клетке анаэробные условия приводят к переключению гликолиза на образование лактата. Об этом свидетельствует динамика изменения активности ЛДГ в цитозоле клеток: активность фермента практически отсутствовала в период максимального потребления кислорода, 1–5 мин и резко повышалась через 10–15 мин. Снижение активности внутриклеточной ЛДГ, наблюдавшееся во всех случаях после 30 мин действия ДЭТ, отражает выход фермента из клеток в результате нарушения целостности их мембран.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 12-04-01226а).

Литература

1. Юдина Т.Г., Бурцева Л.И. Действие дельта-эндотоксинов четырех подвигов *B. thuringiensis* на различных прокариот // Микробиология. – 1997. – Т. 66, № 1. – С. 17–22.
2. Каменек Л.К., Левина Т.А., Терехин Д.А., Миначева Л.Д. Антибактериальное действие дельта-эндотоксина *Bacillus thuringiensis* как потенциального агента защиты растений // Биотехнология. – 2000. – № 1. – С. 59–67.
3. Kamenek L.K., Kamenek D.V., Terpilowski M.A., Gouli V.V. Antifungal action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin against pathogenic fungi related to *Phytophthora* and *Fusarium* // Int. J. Agricultural Technol. – 2012. – V. 8, No 1. – P. 191–203.
4. Chestukhina G.G., Kostina L.I., Mikhailova A.L., Tyurin S.A., Klepikova F.S., Stepanov V.M. The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin molecular structure // Arch. Microbiol. – 1982. – V. 132. – P. 159–162.
5. Carroll J., Ellar D.J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light-scattering assay // Eur. J. Biochem. – 1993. – V. 214, No 3. – P. 771–778.
6. Каменек Д.В., Ильинская О.Н., Цофина Л.М., Каменек Л.К. Дельта-эндотоксин *Bacillus thuringiensis* как природный ионофор: анализ методами ИК- и ЯМР-спектроскопии // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, кн. 1. – С. 69–76.
7. Höfte H., Whiteley H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* // Microbiol Rev. – 1989. – V. 53, No 2. – P. 242–255.
8. Pendleton I.R., Morrison R.B. Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* // Nature. – 1966. – V. 212. – P. 728–729.
9. Cooksey K.E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of lepidoptera // Biochem. J. – 1968. – V. 106, No 2. – P. 445–454.
10. Дронина М.А., Ревина Л.П., Костина Л.И., Ганушкина Л.А., Залунин И.А., Честухина Г.Г. Токсинсвязывающие белки из мембран кишечного эпителия личинок *Anopheles stephensi* // Биохимия. – 2006. – Т. 71, Вып. 2. – С. 173–181.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, No 1. – P. 265–275.

12. Клунова С.М., Банников В.М. Определение активности лактатдегидрогеназы и 3-фосфоглицератдегидрогеназы в грене тутового шелкопряда спектрофотометрическим методом // Методы анализа белков и нуклеиновых кислот в тканях и органах насекомых: Сб. ст. – М.: Изд-во МГПИ, 1980. – Ч. 1. – С. 80–82.
13. Manometric techniques: a manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism. – Minneapolis, Minn.: Burgess Pub. Co., 1964. – 305 p.
14. Coloff J.L., Macintyre A.N., Nichols A.G., Liu T., Gallo C.A., Plas D.R., Rathmell J.C. Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition // Cancer Res. – 2011. – V. 71, No 15. – P. 5204–5213. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4531.
15. Ebersold H.R., Lüthy P., Huber H.E. Membrane damaging effect of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* // Experientia. – 1980. – V. 36. – P. 495–496.

Поступила в редакцию
21.05.13

Каменек Дмитрий Валерьевич – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры общей и биологической химии, Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия.

E-mail: kamenek@mail.ru

Колпаков Алексей Иванович – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биосинтеза и биоинженерии ферментов, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: alexei.kolpakov@kpfu.ru

Каменек Людмила Кирилловна – доктор биологических наук, профессор кафедры общей и биологической химии, Ульяновский государственный университет, г. Ульяновск, Россия.

E-mail: kameneklk@mail.ru

* * *

EFFECT OF *Bacillus thuringiensis* subsp. sotto 617 DELTA-ENDOTOXIN ON THE PROCESS OF GLYCOLYSIS IN CELL CULTURE HeLa

D.V. Kamenek, A.I. Kolpakov, L.K. Kamenek

Abstract

This research work demonstrates the action of the delta-endotoxin of *B. thuringiensis* subsp. sotto 617 on glycolysis in HeLa human cervical cancer cells. The increased aerobic glycolysis through the formation of 3-phosphoglycerate and the activation of 3-phosphoglycerate dehydrogenase in the presence of the delta-endotoxin during the first 10 minutes of the experiment was established. It was also detected that the increase in the activity of lactate dehydrogenase in HeLa cells correlates with the depletion of oxygen consumption followed by the 15–30 minute in vitro experiment. The initial respiratory stimulation of the cells led to an acceleration of glucose catabolism with the formation of pyruvate and 3-phosphoglycerate and, as a consequence, respiratory chain substrates in the presence of the toxin in the first 10 minutes of the experiment. A decrease in the activity of intracellular lactate dehydrogenase was observed in all cases after 30-minute action of the delta-endotoxin as a result of the destabilization of cell membranes and the release of the enzyme.

Keywords: delta-endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, culture of cancer cells, 3-phosphoglycerate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, glycolysis, cell respiration.

References

1. Yudina T.G., Burtseva L.I. Effect of delta-endotoxins of the four subtypes of *B. thuringiensis* on different prokaryotes. *Mikrobiologiya*, 1997, vol. 66, no. 1, pp. 17–22. (In Russian)
2. Kamenek L.K., Levina T.A., Terekhin D.A., Minacheva L.D. Antibacterial action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin as a potential agent of plant protection. *Biotekhnologiya*, 2000, no. 1, pp. 59–67. (In Russian)
3. Kamenek L.K., Kamenek D.V., Terpilowski M.A., and Gouli V.V. Antifungal action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin against pathogenic fungi related to *Phytophthora* and *Fusarium*. *Int. J. Agric. Technol.*, 2012, vol. 8, no. 1, pp. 191–203.
4. Chestukhina G.G., Kostina L.I., Mikhailova A.L., Yurin S.A., Klepikova F.S., Stepanov V.M. The main features of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin structure. *Arch. Microbiol.*, 1982, vol. 132, pp. 159–162.
5. Carroll J., Ellar D.J. An analysis of *Bacillus thuringiensis* endotoxin action on insect-midgut-membrane permeability using a light scattering assay. *Eur. J. Biochem.*, 1993, vol. 214, pp. 771–778.
6. Kamenek D.V., Ilinskaya O.N., Tsofina L.M., Kamenek L.K. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin as a natural ionophore: analysis by IR and NMR spectroscopy. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2008, vol. 150, no. 1, pp. 69–76. (In Russian)
7. Höfte H., Whiteley H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 1989, vol. 53, no. 2, pp. 242–255.
8. Pendleton I.R., Morrison R.B. Separation of the spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Nature*, 1966, vol. 212, pp. 728–729.
9. Cooksey K.E. Purification of a protein from *Bacillus thuringiensis* toxic to larvae of lepidoptera. *Biochem. J.*, 1968, vol. 106, pp. 445–454.
10. Dronina M.A., Revina L.P., Kostina L.I., Ganushkina L.A., Zalunin I.A., Chestukhina G.G. Toxin-binding proteins from membranes of intestinal epithelium of *Anopheles stephensi* larvae. *Biokhimiya*, 2006, vol. 71, no. 2, pp. 173–181.
11. Lowry O.H., Rosenbrough N. J., Farr A.L., Randall R.T. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
12. Klunova S.M., Bannikov V.M. Activity determination of lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate dehydrogenase in silkworms eggs by spectrophotometric method. *Metody analiza belkov i nukleinykh kislot v tkanyakh i organakh nasekomykh* [Methods of analysis of proteins and nucleic acids in the tissues and organs of insects]. Moscow: Izd. MGPI, 1980, vol. 1, pp. 80–82.
13. Manometric techniques: a manual describing methods applicable to the study of tissue metabolism. Minneapolis, Minn., Burgess Pub. Co., 1964. 305 p.
14. Coloff J.L., Macintyre A.N., Nichols A.G., Liu T., Gallo C.A., Plas D.R., Rathmell J.C. Akt-dependent glucose metabolism promotes Mcl-1 synthesis to maintain cell survival and resistance to Bcl-2 inhibition. *Cancer Res.*, 2011, vol. 71, no. 15, pp. 5204–5213. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4531.
15. Ebersold H.R., Lüthy P., Huber H.E. Membrane damaging effect of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Experientia*, 1980, vol. 36, pp. 495–498.

Received
May 21, 2013

Kamenek Dmitrii Valerievich – PhD in Biology, Senior Lecturer, Department of General and Biological Chemistry, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia.
E-mail: kamenek@mail.ru

Kolpakov Alexei Ivanovich – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Biosynthesis and Biological Engineering of Enzymes, Kazan Federal University, Kazan, Russia.
E-mail: Alexei.Kolpakov@ksu.ru

Kamenek Lyudmila Kirillovna – Doctor of Biology, Professor, Department of General and Biological Chemistry, Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia.
E-mail: kameneklk@mail.ru