

Токсины — это секретируемые микробные белки, обычно ферменты, которые убивают клетки мишени в исключительно маленьких концентрациях.

Эндотоксины являются структурными компонентами микроорганизма, которые высвобождаются после его гибели.

Экзотоксины вырабатываются микроорганизмом, обеспечивая его защиту.

Большинство токсинов имеет А-В структуру.

В-субъединица участвует в связывании токсина с рецептором на поверхности клетки мишени и способствует транспортировке токсина в цитоплазму клетки. Структура В-доменов зависит от структуры рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин и, как правило, является специфической, поскольку зависит от определенных рецепторов на поверхности клетки-мишени.

А-субъединица проявляет энзиматическую (токсическую) активность. А-субъединицы более консервативны, особенно в участках, критических для их ферментативной активности.

Токсины по механизму действия подразделяют на 5 типов:

1. Повреждающие клеточные мембраны (порообразующие токсины). К ним относят бактериальные токсины, функционирующие посредством вставки в плазматическую мембрану хозяина и формирующие в ней трансмембранные поры, приводящие клетку к лизису. Такие токсины еще называют RTX-семейством из-за наличия в их молекулах большого количества повторов;
2. Ингибиторы белкового синтеза. Субстратами для этих токсинов служат факторы элонгации и рибосомальная РНК;
3. Активаторы вторичных мессенджеров (посредников). Бактериальные токсины могут влиять на функцию отдельных белков эукариотической клетки. Например, осуществлять модификацию ГТФ-связывающих белков, которые участвуют в работе цитоскелета (семейство белков Rho), везикулярном транспорте (семейство Rab) и в регуляции роста и дифференциации клеток (семейство Ras).

4. Активаторы иммунного ответа. Отдельные бактериальные токсины могут действовать непосредственно на Т-клетки и антигенпрезентирующие клетки иммунной системы. Самое большое семейство токсинов данного типа называют токсинами-суперантигенами (PTSAg). Как правило, иммуностимулирующий эффект таких токсинов является следствием их способности связывать различные участки белков главного комплекса гистосовместимости II типа и воздействовать на рецепторы Т-клеток;
5. Протеазы или нейротоксины. Эти достаточно сходные по структуре токсины по-разному воздействуют на нервные клетки. В частности, связываются с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны двигательных нейронов периферической нервной системы и вызывают протеолиз белков в нейронах. Это приводит к ингибированию высвобождения ацетилхолина и к предотвращению мышечных сокращений — возникает **вялый паралич**. Могут сначала связывается с рецепторами на пресинаптической мембране двигательных нейронов, но затем перемещаются в нейроны спинного мозга и нарушают высвобождение глицина и гамма-амино-масляной кислоты, вызывая **центральный паралич**.

Одними из первых охарактеризованных токсинов, продуцируемых бактериями *E. coli*, были **колицины**. В 1925 г. А. Грация обнаружил вещества белковой природы, синтезируемые бактериями *E. coli* и обладающие антибактериальным действием в отношении других штаммов *E. coli*. Они характеризовались узким спектром действия и были активны только в отношении близкородственных бактерий. В 1953 г. все они получили название «**бактериоцины**». В настоящее время способность к синтезу бактериоцинов обнаружена у различных видов как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. В большинстве случаев бактериоцины называют в соответствии с **видовой принадлежностью** бактерий-продуцентов: **колицины** – *Escherichia coli*; **марцесцины** – *Serratia marcescens*; **флюоцины** – *Pseudomonas fluorescens* и т. д. Некоторые авторы используют **родовое** название бактерий-продуцентов: **стафилококкцины** – *Staphylococcus epidermidis*, **вибриоцины** – *Vibrio comma* и т. д.

Бактериоцины – это вещества белковой природы или представленные белком в комплексе с липополисахаридами, (за антибактериальную активность бактериоцина отвечает белок).

Бактериоцины различаются по спектру действия и по физико-химическим, морфологическим и некоторым другим свойствам.

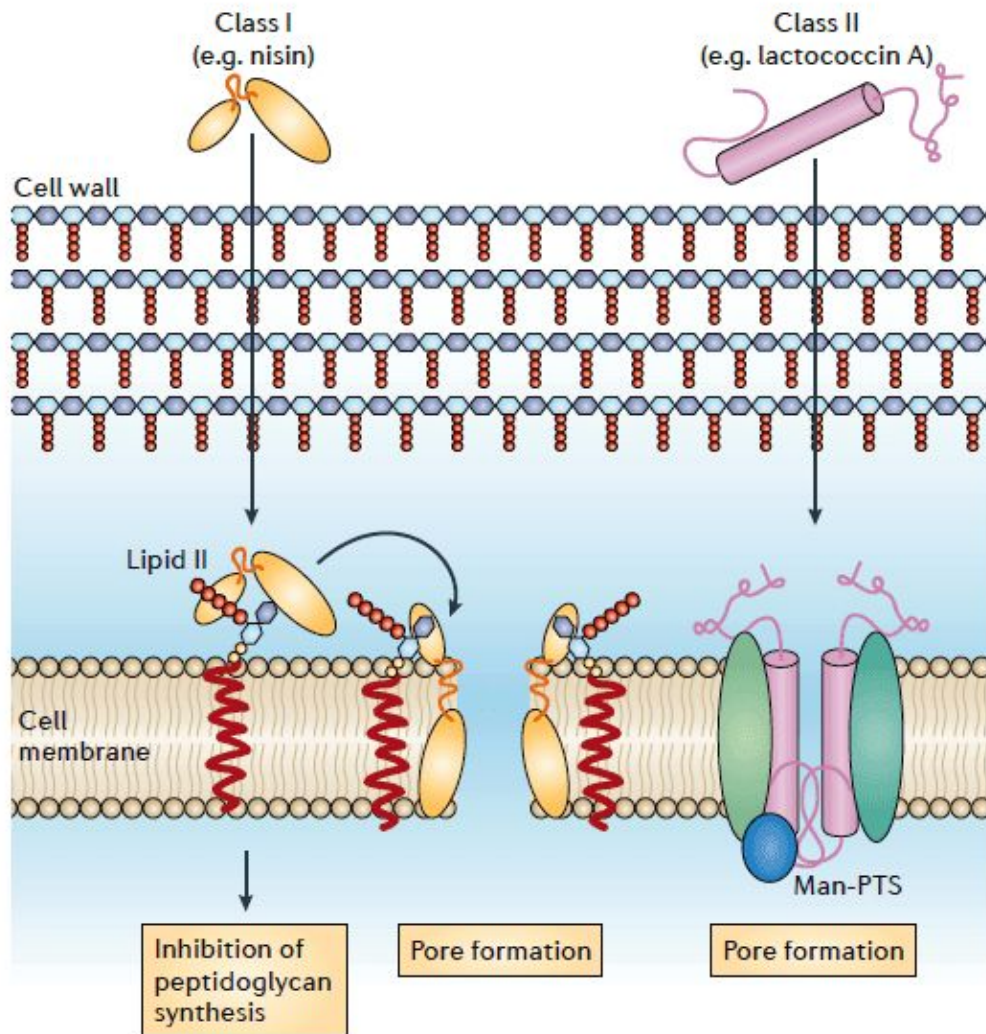
Согласно наиболее принятой классификации Д. Бредли (1967), бактериоцины делят:

.Бактериоцины с низкой молекулярной массой, которые не осаждаются при ультрацентрифугировании, чувствительны к протеолитическому ферменту трипсину, термостабильны и неразличимы в электронном микроскопе;

.Бактериоцины с высокой молекулярной массой, которые легко осаждаются при ультрацентрифугировании, резистентны к ферменту трипсину, термолабильны, выявляются в электронном микроскопе как фагоподобные структуры или их компоненты; бактериоцины, для которых четко показана ферментативная активность.

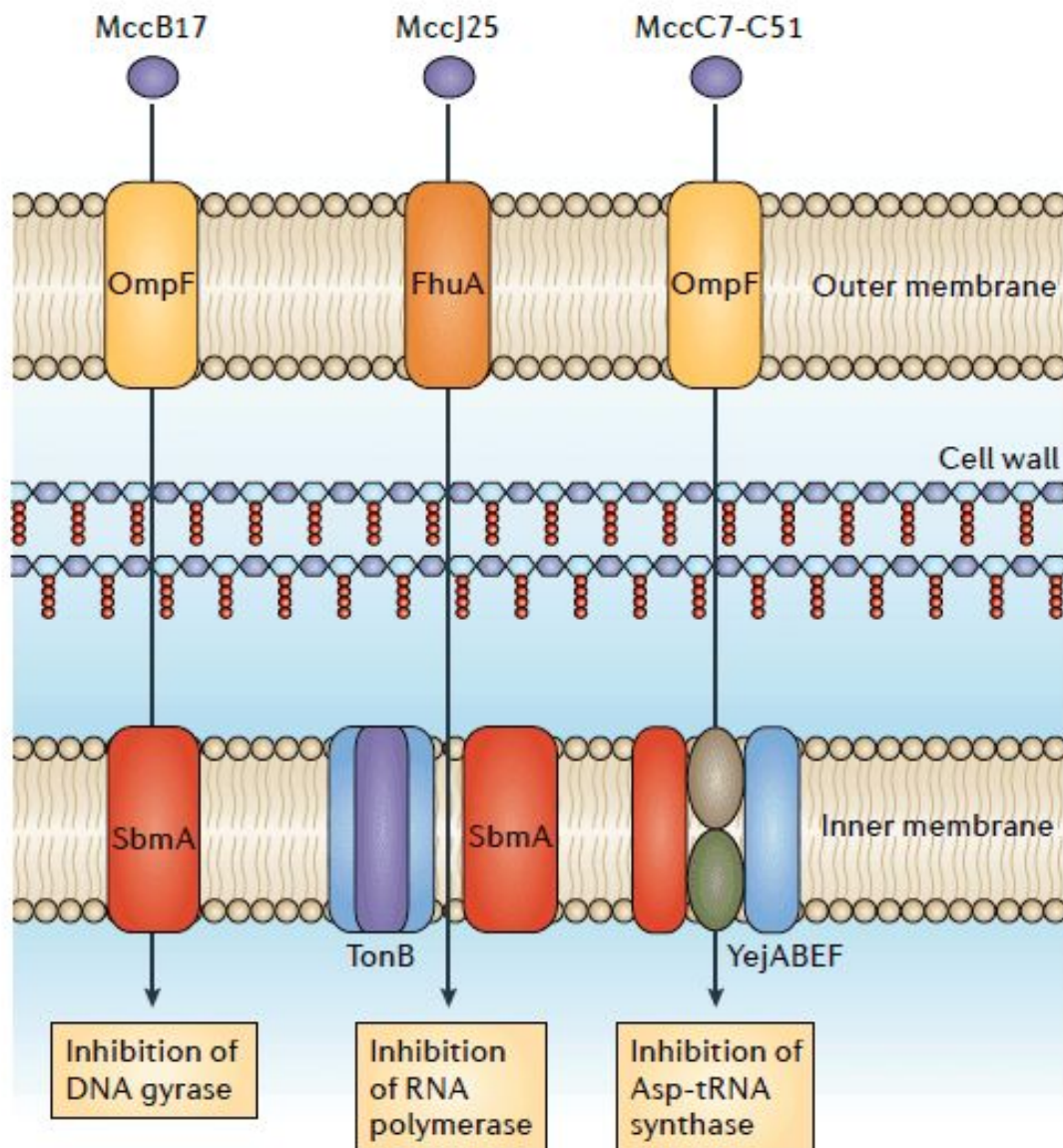
По механизму действия на бактериальную клетку бактериоцины подразделяют на 4 основные группы:

1. Ингибирующие окислительное фосфорилирование в цитоплазматической мембране;
2. Разрушающие ДНК;
3. Блокирующие синтез белков;
4. Нарушающие полупроницаемость цитоплазматической мембраны.



Грамположительные бактерии продуцируют: **Бактериоцины класса I** (низин и др) ингибируют синтез пептидогликана, связываясь с липидом II, образуют поры.

Бактериоцины класса II, (лактококцин А), связываются со порообразующей рецепторной маннозо-фосфотрансферной системой (Man-PTS). После связывания бактериоцин усиливает проницаемость мембраны, что и приводит к клеточной гибели. Вероятно, пора в мембране образуется за счет олигомеризации молекул бактериоцина, либо за счет разрушения маннозо-ФТС комплекса.



Грамотрицательные бактерии продуцируют микроцины, которые ингибируют ДНК-гиразу (MccB17), РНК-полимеразу (MccJ25) и аспартил-тРНК-синтетазу (MccC7-C51)

Существует два типа колициногенных плазмид, различающихся по размеру, количеству копий в клетке и способности к переносу путем конъюгации.

.Колициногенные плазмиды I типа имеют небольшие размеры (например, pColE1 составляет 6,6 кб), встречаются в клетке в большом количестве копий и кодируют колицины группы A.

. Колициногенные плазмиды типа II имеют большой размер (например, pColH составляет 94 т.п.н.), только одна копия на клетку и часто способны к переносу путем конъюгации. Большие плазмиды могут содержать один или два колициновых оперона и, следовательно, клетки, содержащие плазмиды типа II, могут продуцировать до двух различных колицинов.

Различные плазмиды могут кодировать сходные колициновые белки.

Опероны колицина включают кластер генов, состоящий из двух-трех генов:

- . структурного гена (*col* или *sca*),
- . гена белка иммунитета (*imm* или *sxi*)
- . гена литического белка (*kil* или *sxl*).

Ген, кодирующий белок иммунитета, расположен ниже структурного гена. Гены, кодирующие белок лизиса, всегда являются последним геном в опероне колицинов группы А, в то время как представители группы В обычно не имеют гена лизиса. Продукт *sxl* представляет собой белок лизиса (также называемый белком высвобождения колицина или белком высвобождения бактериоцина), небольшой липопротеин, участвующий в высвобождении колицина в среду и гибели клеток после индукции.

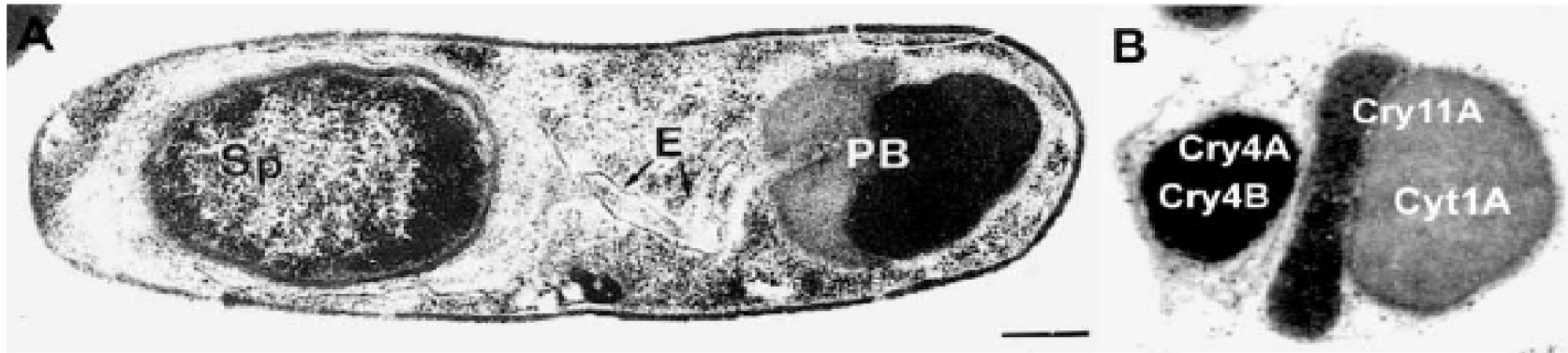
Колицины не вырабатываются в бактериальных клетках в нормальных условиях, но в клетке постоянно присутствует ограниченное количество молекул колицина. Количество колицина резко возрастает под действием различных агентов, повреждающих ДНК (например, ультрафиолетового излучения и антибиотика митомицина С), а также факторов окружающей среды, таких как недостаток питательных веществ или увеличение плотности популяции бактерий. Агенты, вызывающие повреждение ДНК или стресс, приводят к «SOS-ответу», активируя протеиназу RecA с последующей инактивацией ауторасщепления белка LexA (репрессор синтеза колицина), что обеспечивает транскрипцию оперона колицина, который накапливается в клетке и высвобождается за счет лизиса клетки. Колицины группы В не имеют гена *kil*, и их синтез не приводит к гибели клетки (выводятся за пределы клетки с помощью Top-системы мембранного транспорта).

Хорошо изученными являются токсины продуцируемые бактериями *Bacillus thuringiensis* (BT), которые приводят к гибели насекомых. Как правило, гены, детерминирующие их синтез, локализованы в составе крупных конъюгативных плазмид.

Впервые бактерии *B. thuringiensis* была выделена в 1915 г. Берлинером из больных гусениц мельничной огневки. Вид *Bacillus*, названный *thuringiensis* получил свое название от провинции Thuringia в Германии, где впервые был обнаружен в организме инфицированной моли.

Бактерии *Bacillus thuringiensis* продуцируют:

1. α -экзотоксин (фосфолипаза C), является продуктом растущих клеток; предполагают, что эффект данного токсина, летальный для насекомых, связан с разрушением мембранных фосфолипидов.
2. термостабильный β -экзотоксин, состоящий из аденина, рибозы и фосфора. Предполагают, что его молекула представляет собой нуклеотид, сложно связанный через рибозу с аллослизиевой кислотой, а его токсическое воздействие состоит в прекращении синтеза насекомыми РНК.
3. Определенный вклад в вирулентность могут вносить также фосфолипазы, протеазы, хитиназы и так называемые VIP-токсины - белки, секретируемые во время фазы вегетативного роста клеток *B. thuringiensis*



Клетка *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* после споруляции (А) и её типичное параспоральное тельце с указанием взаиморасположения в нём включений индивидуальных токсинов (В). Sp – спора, E – экзоспориум, PB – параспоральное тельце (Federici et al., 2003)

δ-эндотоксины: семейства Cry и Cyt белков

Группа I - активны против чешуекрылых (Lepidoptera) -

Группа II - активны против чешуекрылых и двукрылых (Lepidoptera and Diptera)

Группа III - активны против жесткокрылых (Coleoptera)

Группа IV - активны против двукрылых (Diptera)

Группа V-VI - активны против нематод (Nematode)

Чешуекрылые - Cry1, Cry2 и Cry9

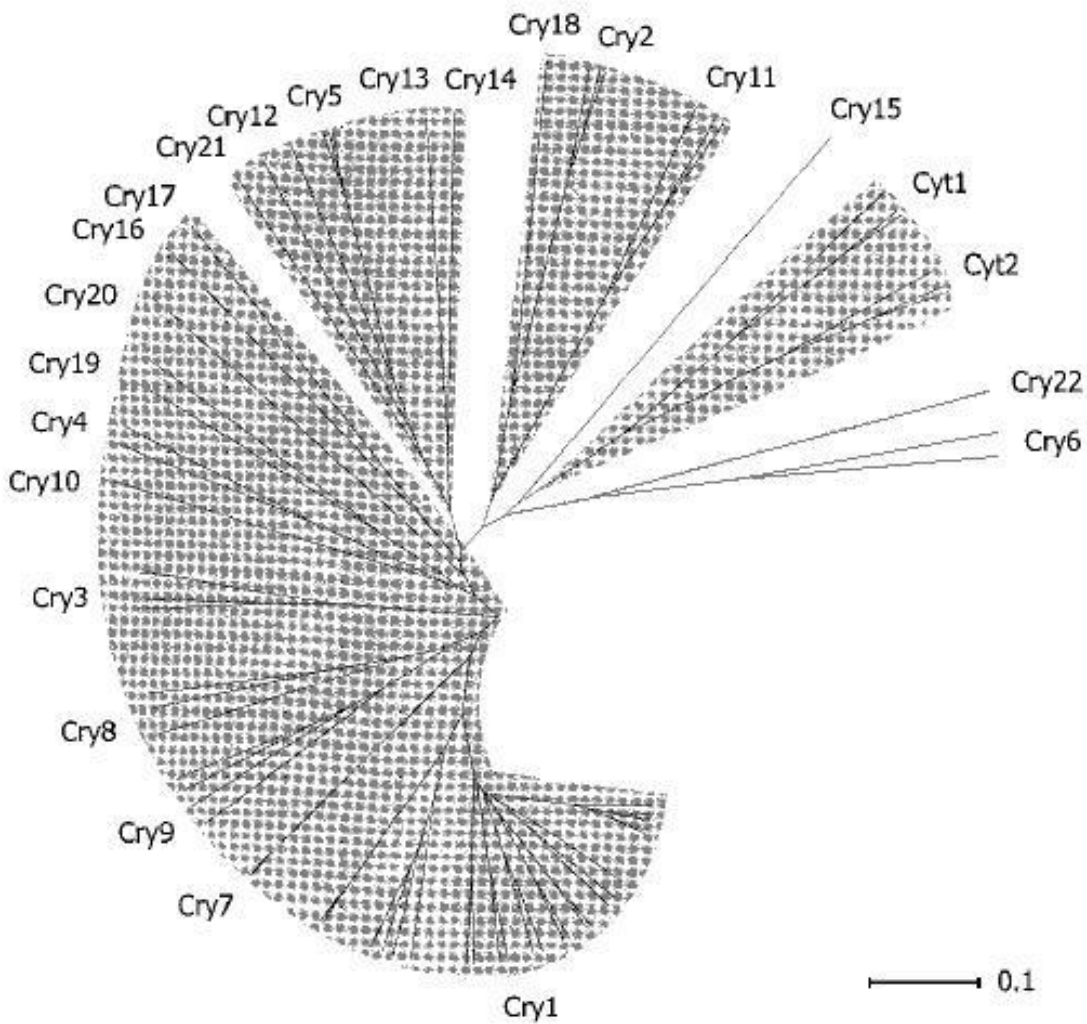
Жесткокрылые - Cry3, Cry7 и Cry8

Двукрылые - Cry2, Cry4, Cry10, Cry11, Cry16, Cry17, Cry19 и Cyt

Нематоды -Cry5, Cry12, Cry13 и Cry14



Электронномикроскопическая фоторнафия *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* berliner 1715 в процессе споруляции. Черным обозначено пароспоральное включение, представляющее собой белковый кристалл



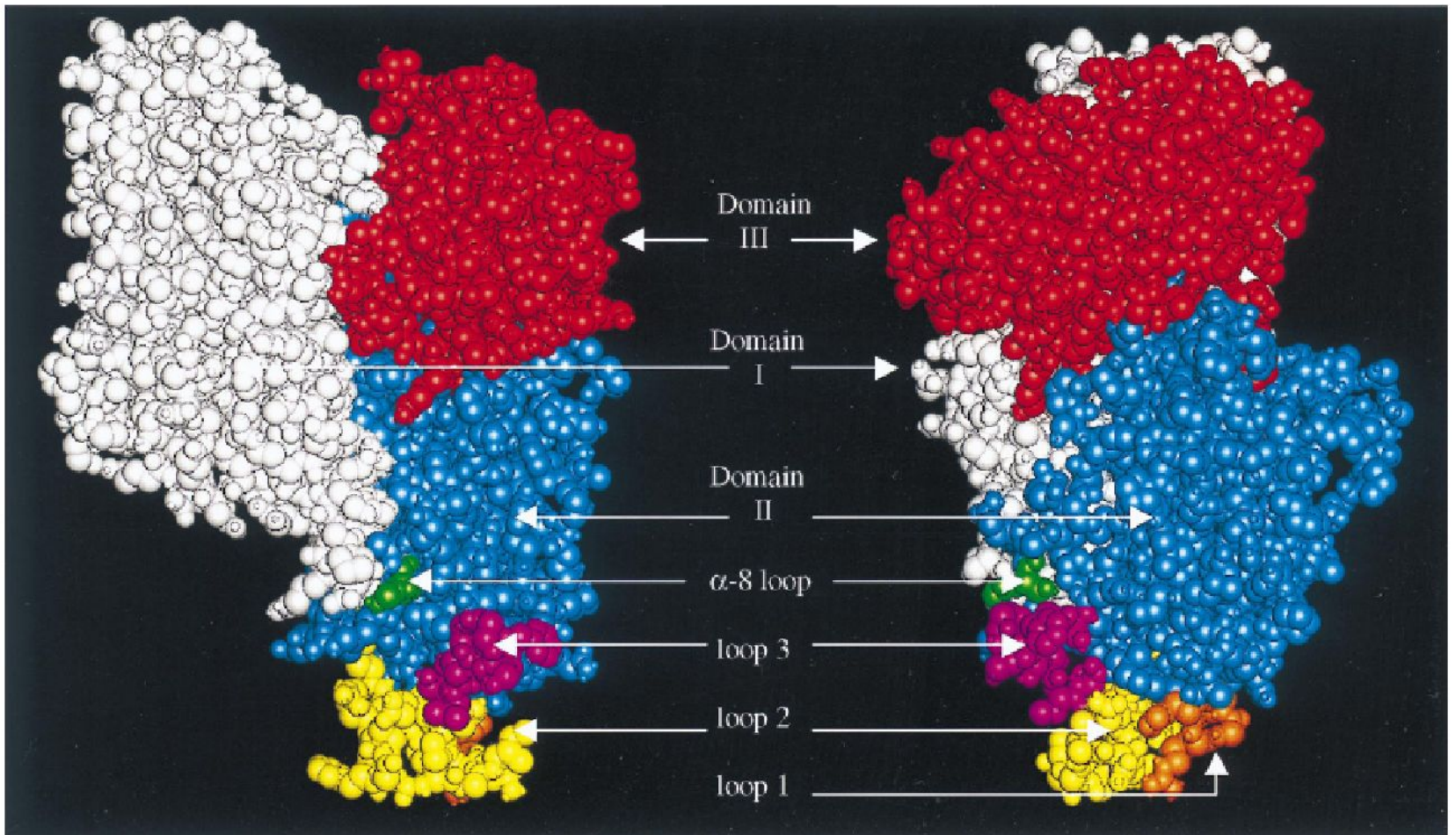
Группы Cry- и Cyt-белков, выделенные на основании сходства их аминокислотных последовательностей

Белки Crg состоят из трех доменов:

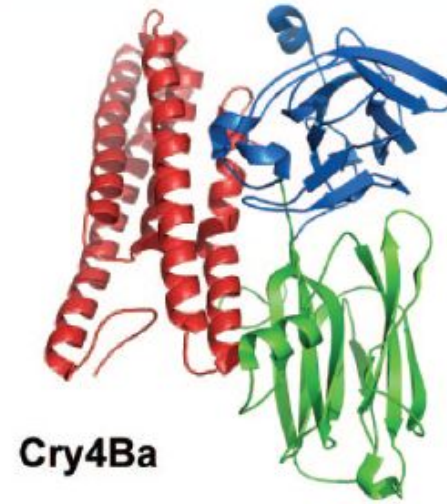
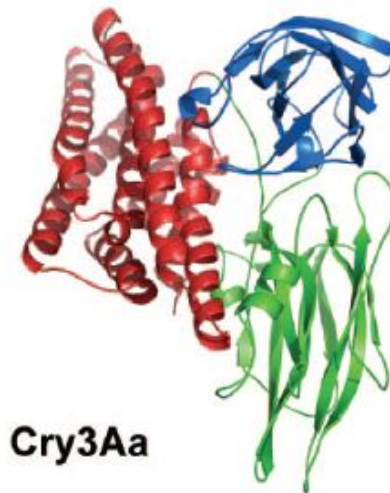
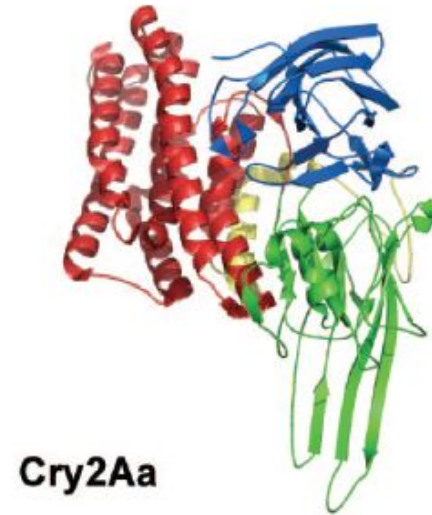
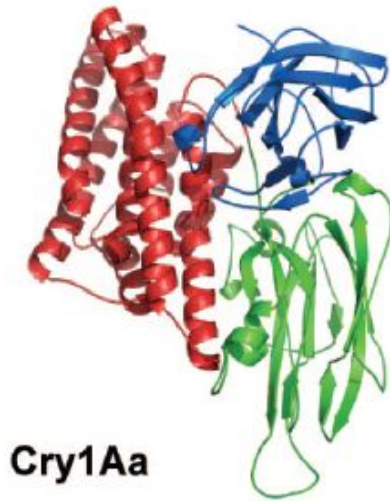
Домен I состоит из 6 α -спиральных белковых молекул, имеющих амфипатическую природу (т.е. имеет и гидрофильную, и гидрофобную части). Гидрофильные части молекул обращены наружу, а гидрофобные остатки, обычно ароматической природы, вовнутрь. **Домен I – играет ключевую роль в образовании пор в плазматической мембране** (например, мембране эпителиальных клеток кишечника насекомых), обеспечивая **встраивания белковой молекулы токсина в липидный бислой мембраны, пронизывая его.**

Домен II образован тремя белковыми молекулами, образующими структуру β -слоев. При этом два слоя обращены наружу, а третий располагается рядом с доменом I. По своей структуре домен II проявляет наибольшую вариабельность. **Домен II играет ключевую роль в определении специфичности действия белков токсинов, связываясь с определённым рецептором на плазматической мембране.** Важная роль в процессе связывания токсина с цитоплазматической мембраной принадлежит петельным структурам. Изменение последовательности аминокислот в области петельных структур ведет к выраженному снижению токсичности белковой молекулы.

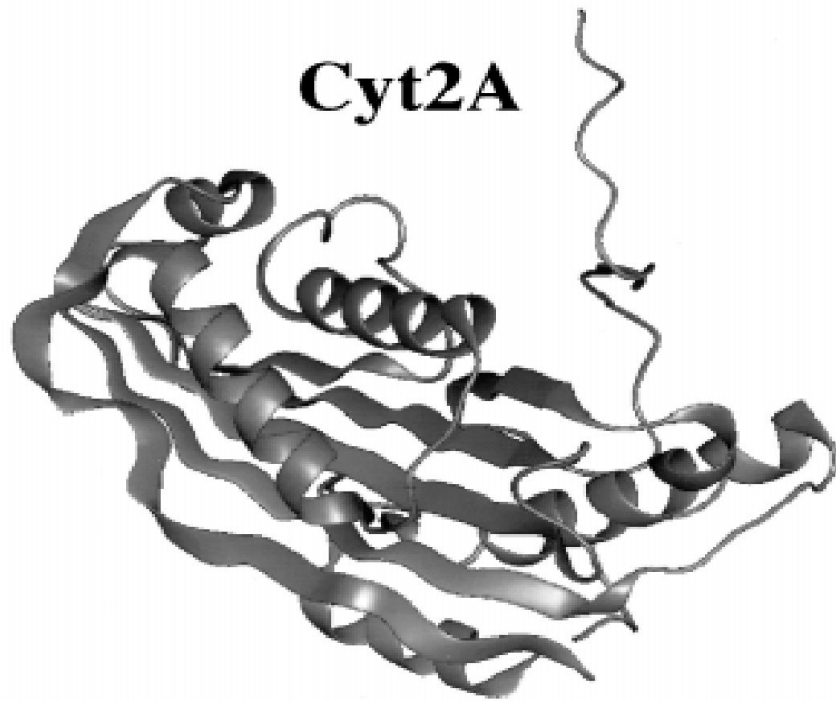
Домен III представлен двумя β -слоями, один из которых обращен наружу молекулы, а второй - располагается рядом с доменом II. **Домен III обеспечивает связывание с определёнными углеводами, на основании чего полагают, что он усиливает действие токсина путём повышения его эффективной концентрации на поверхности плазматической мембраны.**



Трехмерная структура Cry1Ab белка



Кристаллическая структура белков Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Aa и Cry4Ba
Домен I обозначен красным цветом
Домен II обозначен зеленым цветом
Домен III обозначен голубым цветом



Белки Cyt включают один домен

Белки cyt-семейства, в отличие от cyt-токсинов, способны вызывать лизис многих типов клеток, что обусловлено их структурой, т.к. у них не найден специфический домен, ответственный за связывание со строго определённым типом рецепторов, а механизм их действия отличен от такового cyt-токсинов. В последние годы вызывают пристальное внимание белки, относящиеся к cyt-семейству, которые были названы **параспоринами** (параспорин-1 и параспорин-2). Для параспоринов характерно то, что они не являются инсектицидными белками, но обладают активностью в отношении клеток позвоночных животных, в частности, млекопитающих, а также специфически распознают и уничтожают клетки раковых опухолей печени и толстой кишки человека и определённые типы нормальных клеток человека.

Процесс действия δ -эндотоксинов Cry-семейства включает несколько этапов:

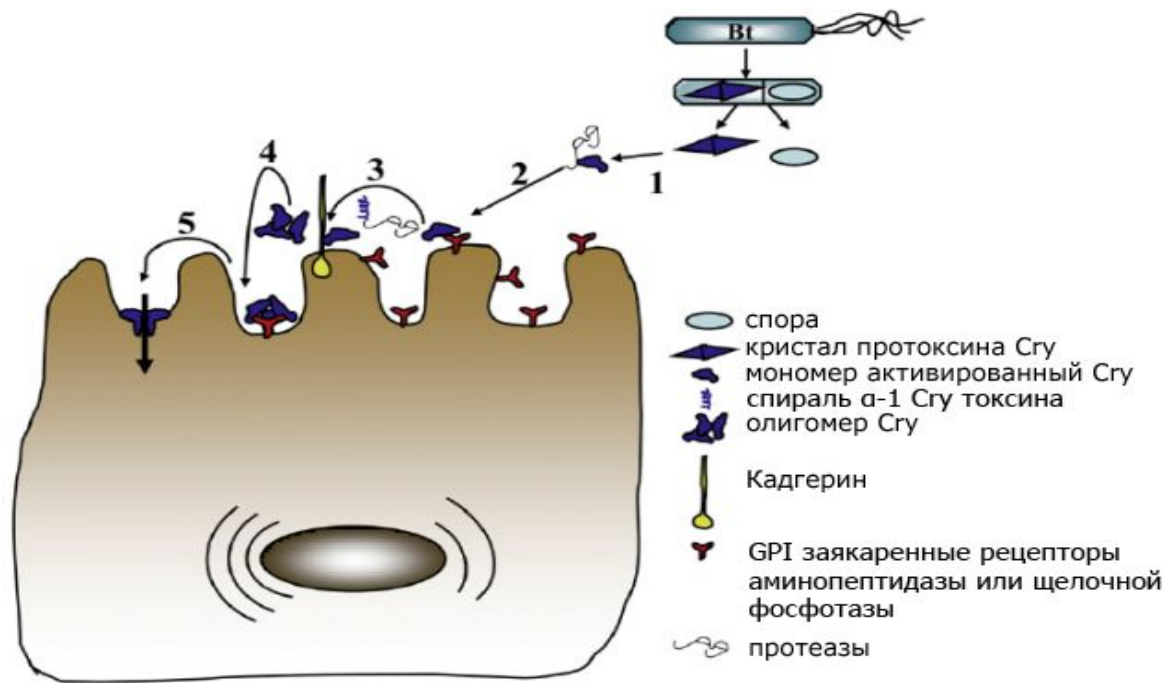
Этап 1. Растворение кристаллических включений, содержащих молекулы протоксина, в кишечнике насекомых за счёт наличия в нём определенных условий (определённый pH, присутствие кишечных ферментов). Превращение протоксина (неактивной формы) в токсин (активная форма) путём частичного протеолиза под воздействием протеаз кишечного сока насекомых. При этом отщепление аминокислотных последовательностей, не входящих в состав зрелого токсина, может происходить для различных токсинов либо с N-, либо с C-конца молекулы протоксина.

Этап 2. Связывание активного токсина с первым специфическим рецептором на мембране щёточной каёмки кишечного эпителия (самый распространённый класс рецепторов – кадгериновые рецепторы).

Этап 3. Конформационное изменение молекулы токсина, индуцированное контактом с первым специфическим рецептором, приводит к отщеплению небольшого фрагмента аминокислотной последовательности с N-конца молекулы – α -спирали 1. Это отщепление делает открытыми гидрофобные области домена I, которые ранее были обращены вовнутрь и, таким образом, закрыты и инициирует формирование из четырёх таких молекул токсина единой тетрамерной структуры.

Этап 4. Олигомерная структура (тетрамер), обладая повышенным сродством ко второму специфическому рецептору, аминопептидазе N (APN), эффективно связывается с ним. Аминопептидаза N способствует встраиванию олигомерной структуры в мембрану клетки, в результате чего формируется пора.

Этап 5. На последнем этапе протекают процессы, приводящие к гибели животной клетки в результате осмотического шока, лизиса клеток вследствие свободного прохождения воды и растворённых веществ через поры, а также в результате серии определённых внутриклеточных сигналов, приводящих к запуску процесса гибели клетки.



В соответствии с моделью Bravo при формировании в мембране одной клетки до двухсот пор, имеющих радиус 0,5-1нм, происходит очень быстрое изменение мембранного потенциала клетки, выравнивание концентрации ионов по обе стороны мембраны, приток воды в клетку, её разбухание и осмотический ЛИЗИС.

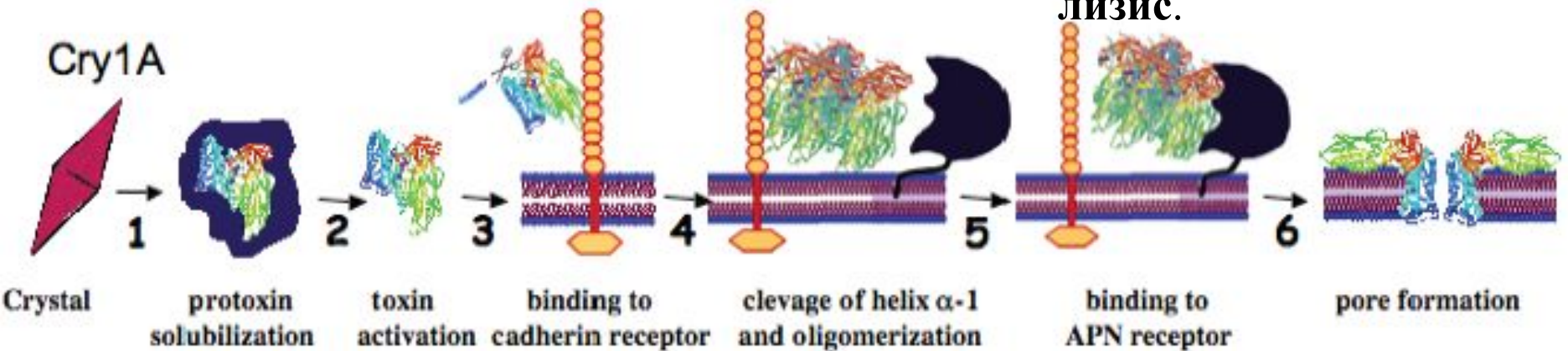


Схема действия δ -эндотоксина на клетку-мишень на примере Cry1A токсина по модели Bravo (По Soberon, Bravo, 2008)

Пути возникновения устойчивости насекомых к δ -эндотоксинам.

1. На активность инсектицидных токсинов ВТ могут оказывать действие протеазы кишечника насекомых. При этом для различных токсинов их действие может быть различным, усиливающим или ингибирующим. В частности, для токсина Cry1Ab показано, что протеолитическое отщепление фрагментов мембранными протеазами снижает уровень его активности.

2. Изменение рецепторов мембраны животных клеток:

-первая стадия взаимодействия является быстрой и обратимой, может ингибироваться определёнными сахарами и реагентами, используемыми для разрыва белок-белковых взаимодействий.

-вторая стадия – медленная и необратимая, не ингибируется указанными веществами. В случае использования мутантного штамма ВТ, продуцирующего изменённый Cry1Ac токсин, способный связываться с APN на первой, а не на второй стадии, было показано снижение его уровня активности по отношению к личинкам *Manduca Sexta* (бражник табачный вредитель табака) .

Всего предложено **три** модели механизма цитотоксического действия δ -эндотоксинов на клетки кишечного эпителия насекомых, которые являются не взаимоисключающими, а взаимодополняющими. Помимо вышеупомянутой модели Bravo существуют модели Zhang и Jurat-Fuentes.

Согласно **модели Zhang**, токсичность Ctu-протеинов определяется не только способностью вызывать осмотический лизис клетки. В этом случае мономерный Ctu-токсин, связываясь с первичным рецептором, инициирует - зависимый каскадный сигнальный путь, который влечёт за собой стимуляцию белка G, аденилатциклазы, повышает уровень цАМФ и активирует протеинкиназу A, что приводит к дестабилизации цитоскелета и ионных каналов и влечёт за собой гибель клетки.

Модель Jurat-Fuentes, по сути дела, объединяет в себе две вышеупомянутые модели, подразумевая, что цитотоксичность δ -эндотоксинов зависит как от эффекта осмотического лизиса, так и от инициации специального внутриклеточного сигнального пути. Разница заключается лишь в том, что, в отличие от модели Zhang, автор полагает, что сигнальный путь регулируется фосфатазами, а также взаимодействием токсина с актином, входящим в состав цитоскелета и взаимодействующим с молекулой кадгерина. В отличие от модели Bravo, олигомерный токсин взаимодействует не только с APN, но и с другими определёнными классами рецепторов.

Помимо рассмотренных механизмов действия δ -эндотоксинов установлено, что они способны:

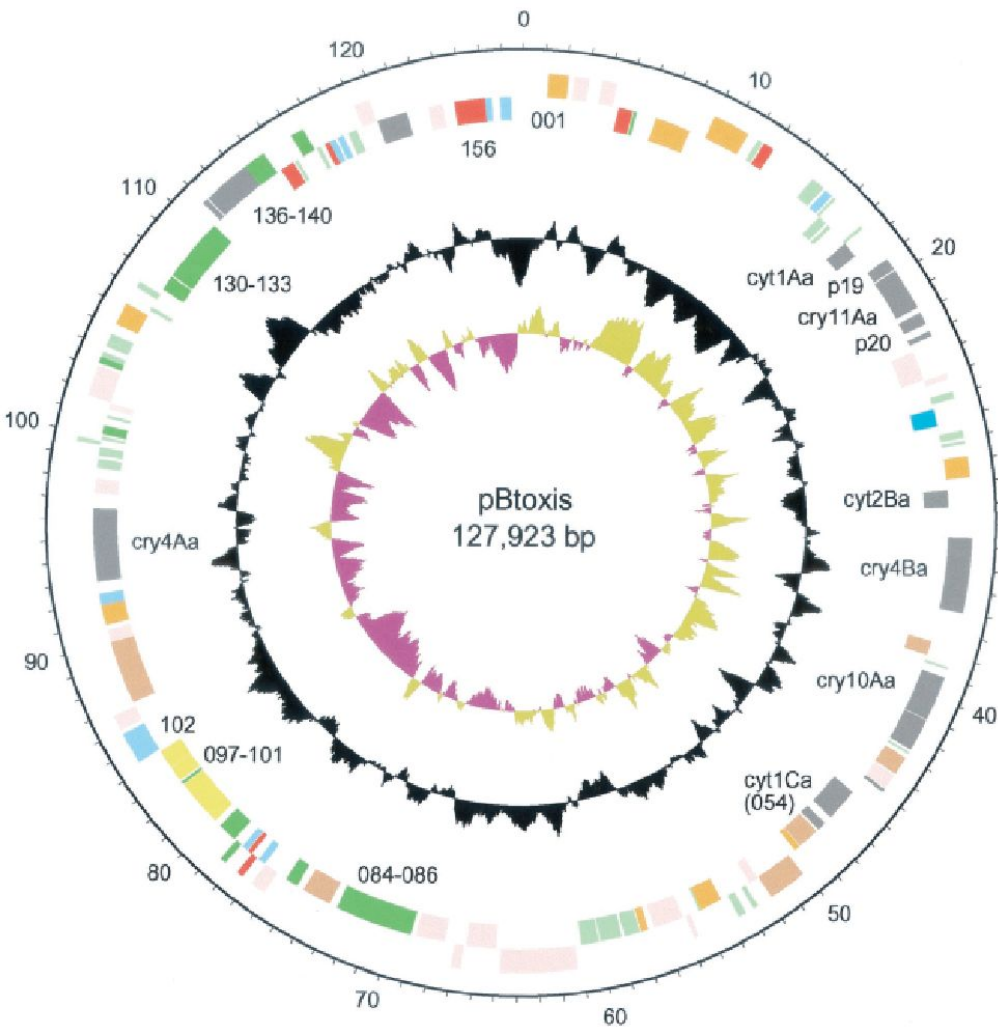
- в 2-5 раз снижать сопротивление искусственных фосфолипидных мембран, причём эта способность прямо пропорциональна концентрации токсина, а методами ИК- и ЯМР-спектроскопии обнаружено, что эндотоксин является потенциальным природным разобщителем-протонофором из-за наличия большого количества лабильных протонов.
- оказывать эффект в гемоцеле (полость кровеносных лакун сосудов и сердца, представляющая собой первичную полость тела) насекомых: Ряд Сгу-токсинов способен при введении их в гемоцель вызывать быстрый паралич и смерть личинок насекомых
- при низких концентрациях приводят к различным нарушениям при окукливании,
- при воздействии на культуру нервных клеток насекомых, полученную из клеток надглоточного ганглия, вызывать лизис и гибель нейронов.

Токсины семейств Vip и Cyt также разрушают клетки по механизму осмотического лизиса, формируя в мембране поры, хотя для некоторых Cyt-токсинов не доказано формирование пор в мембране при их взаимодействии с клеткой.

Например, параспорины, специфически воздействующие на раковые клетки и ряд нормальных клеток человека, обладают отличным от δ -эндотоксинов механизмом действия. Так, действие на клетку параспорина-1 приводит к активации сигнального пути апоптоза, при этом была обнаружена активация G-белка и каспазы, специфического фермента апоптоза. Параспорин-2 действует как цитолизин, обуславливая морфологические изменения всей клетки в целом и её цитоскелета, фрагментацию митохондрий и эндоплазматического ретикулума, а также увеличение проницаемости клеточной мембраны с последующим выходом из клетки большинства цитоплазматических белков.

Многообразие групп токсинов, а также отдельных токсинов является следствием высокой генетической пластичности *Bacillus thuringiensis*. Большинство генов, детерминирующих синтез токсинов, локализованы в больших плазмидах, многие из которых являются конъюгативными. Помимо этого, в составе генома различных штаммов ВТ присутствуют разнообразные транспозируемые генетические элементы – IS-элементы и транспозоны, поэтому Cry-гены в составе плазмид нередко входят в состав сложных транслоцируемых генетических конструкций. В качестве примера можно привести ген Cry1A, фланкированный с обеих сторон инвертированными повторами, которые были определены как вставочные последовательности IS231 и IS232. Эти IS-элементы, очевидно, обеспечивают генетическую мобильность гена Cry1A, образуя вместе с ним типичный сложный транспозон. Кроме конъюгации, перенос генетического материала может обеспечиваться и путём трансдукции. Это обеспечивает возможность обмена генетическим материалом между штаммами ВТ и другими видами бактерий, как близкородственными (*B. cereus*, *B. anthracis*), так и более отдалёнными в генетическом отношении, такими, как *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*

Размер генома различных штаммов ВТ варьирует от 2,4 до 5,7 миллионов п.н. Для большинства штаммов ВТ размер плазмид, находящихся в бактериальной клетке, составляет 2 - 600 т.п.н. Скургены в большинстве своём локализованы в крупных плазмидах.



Плазмида pVtoxis кодирует все шесть токсинов, обнаруженных в клетках этой бактерии: Cry4Aa, Cry4Ba, Cry10Aa, Cry11Aa, Cyt1Aa и Cyt2Ba, а также несёт несколько вставочных последовательностей и кодирует два протеина (P19 и P20), которые способствуют формированию кристаллических внутриклеточных включений и повышают жизнеспособность бактериальной клетки, действуя, вероятно, как шапероны.

Характеристика плазмиды pVtoxis (По Berry et al., 2002)

Общий размер	127 923 п.н.
Содержание G + C	32,42%
Число кодирующих последовательностей	125
Число псевдогенов	8
Кодирующая плотность	63,5%
Средняя длина гена	725 п.н.

Так, у *Bacillus subtilis* процесс прохождения различных этапов жизненного цикла, включая споруляцию, регулируют шесть последовательно активируемых σ -факторов: σ^A , σ^H , σ^F , σ^E , σ^G и σ^K . Такой же механизм активации экспрессии генов во время споруляции характерен и для ВТ, а её соответствующие σ -факторы обладают высокой степенью сходства по аминокислотной последовательности с аналогичными σ -факторами *B. subtilis*.

Нуклеотидная последовательность промоторов некоторых Cry-генов

Промотор	Область -35	Спейсер	Область -10
Распознаваемый σ^E (<i>B. thuringiensis</i>)	GCAATNT	N14 или 15	CATANNNT
Cry1A(a) BtI	GCAATTT	N15	CATATGTTT
Распознаваемый σ^K (<i>B. thuringiensis</i>)	H/O	H/O	TNATANNNTG
Cry1A(a) BtII	H/O	H/O	TCATAAGATG
Распознаваемый σ^A (<i>B. subtilis</i>)	TTGACA	N17 или 18	TATAAT
Cry3A	TTGCAA	N18	TAAGCT

Биотехнологическое использование бактерий *Bacillus thuringiensis*

1) использование различных штаммов ВТ в качестве источника генетических детерминант токсинов с целью создания новых трансгенных организмов, которые изначально не обладают способностью к синтезу пестицидных белков;

2) улучшение уже известных штаммов ВТ и родственных видов путём повышения биологической активности токсинов и расширения спектра действия пестицидных белков, синтезируемых конкретным штаммом, с целью последующего получения биопестицидных препаратов.

Трансгенные растения, способные экспрессировать Cry-гены, обладают высокой степенью устойчивости к своим специфическим вредителям, за исключением случаев приобретения последними устойчивости к токсинам. В качестве примера можно привести трансгенный сорт кукурузы MON863, устойчивый к *Diabrotica* spp. (западного кукурузного жука — *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte). Он был получен путём введения в клетки зародыша растения ДНК-вектора, который содержал модифицированный Cry3Bb1 ген, встроенный под промотор 4-AS1, с которого идёт синтез белка, усиливающего рост корней растения.

Трансгенные бактерии используют в качестве биологического средства борьбы с различными вредителями сельского хозяйства и переносчиками определённых заболеваний.

Рекомбинантный штамм ВТ, несущий наряду с москитоцидными Cry- и Cyt-генами дополнительный ген, детерминирующий бинарный токсин, источником которого послужил геном *Bacillus sphaericus*. Этот трансгенный штамм обладает высокой инсектицидной активностью по отношению к представителям рода *Culex* (*Culex* — это род кровососущих комаров, которые являются специфическими переносчиками возбудителей некоторых вирусных инфекционных болезней).

Путём конъюгационного переноса из клеток ВТ Cry-генов, продукты которых активны в отношении Чешуекрылых, в клетки *Bacillus megaterium* удалось также получить рекомбинантный штамм, продуцирующий инсектицидные белки. Поскольку использованный штамм *B. megaterium* в естественных условиях обитает на поверхности листьев хлопчатника, то обработка растений хлопчатника живой культурой клеток рекомбинантного штамма обусловила высокую степень устойчивости растений к поражению личинками *Heliothis armigera* (хлопковой совки): на протяжении 21 дня после обработки смертность личинок составляла 75-96% .

Повышение инсектицидной активности штаммов ВТ может быть достигнуто путём создания рекомбинантных бактерий, Cry- и Cyt-гены которых происходят из различных штаммов. Таким образом, добиваются расширения спектра действия препаратов, полученных на основе таких генно-инженерных штаммов. В ряде случаев наблюдается синергетический эффект, когда один токсин усиливает действие другого или же оба токсина оказывают взаимоусиливающее влияние. В качестве примера можно привести *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, штамм IPM-46. В препаратах на основе этого рекомбинантного штамма Cry3A токсин проявляет значительно большую активность против колорадского жука, чем в исходном штамме, за счёт усиления его активности токсином Cry1A. Полагают, что в этом случае Cry3A отвечает за связывание с рецепторами на мембране клеток кишечного эпителия колорадского жука, а Cry1A, обладая более высокой пороформирующей способностью по сравнению с Cry3A, образует собственно поры.

Cyt-токсины вследствие более широкого спектра действия и высокой способности к порообразованию способны усиливать активность Cry-токсинов и расширять круг их видов-мишеней, функционируя как мембраносвязанный рецептор для самих Cry-токсинов. Синергетический эффект основан на межмолекулярных взаимодействиях токсинов.

Недостатком непосредственного использования клеток ВТ после споруляции в качестве биопестицида или их споро-кристаллических комплексов является засорение окружающей среды спорами, поэтому часто для наработки токсинов в составе внутриклеточных кристаллических включений используют либо мутантные штаммы ВТ, неспособные к спорообразованию, либо штаммы других видов бактерий, например, представителей рода *Pseudomonas*. В последнем случае можно получить так называемые инкапсулированные биопестициды, в которых δ -эндотоксины защищены от действия повреждающих факторов внешней среды клеточной оболочкой.

Генно-инженерные манипуляции, обеспечивающие направленное изменения определённых последовательностей генов, детерминирующих токсины, могут изменять свойства продукта этих генов. Например, путём сайт-специфического мутагенеза в последовательностях, кодирующих петли домена II, можно получить токсин, проявляющий специфичность уже по отношению к другому виду насекомых-вредителей, а путём изменения сайта распознавания для протеаз в домене I можно повысить активность токсина.

Сферы использования Vt и генов, детерминирующих синтез токсинов:

- 1) Создание и использование рекомбинантных штаммов бактерий для защиты растений от вредителей, для контроля численности и уничтожения насекомых, переносящих возбудителей опасных заболеваний (особенно в тропических странах);
- 2) Внедрение и использование в сельском и лесном хозяйстве трансгенных растений, экспрессирующих гены токсинов VT и устойчивых к различным вредителям;
- 3) Использование VT в промышленном производстве препаратов, обладающих активностью в отношении вредных насекомых, нематод, фитопатогенных грибов и бактерий. Применение в сельском хозяйстве биопестицидов на основе VT для получения большего количества сельхозпродукции вследствие снижения ущерба, наносимого вредителями;
- 4) Использование различных штаммов VT в качестве источников генетических детерминант токсинов для различных генно-инженерных манипуляций;
- 5) Использование в медицине (например, параспорины как противораковые препараты).

Биопрепараты

Лепидоцид – биологический инсектицидный препарат, предназначенный для защиты лесных, сельскохозяйственных и парковых культур от гусениц чешуекрылых насекомых, в числе которых шелкопряды, монашенка, пяденицы, листовертки, в том числе гроздевая, луговой мотылек, капустная и репная белянки, американская белая бабочка, боярышница, совки, моли и др.

Битоксибациллин – биологический инсектицидный препарат, предназначенный для защиты сельскохозяйственных, лесных и лекарственных культур от насекомых-вредителей: колорадский жук (личинки I-III возраста), паутинный клещ, гусеницы капустной совки, капустной и репной белянок, капустной моли, огневки, яблонной и плодовой моли, боярышницы, листоверток, шелкопрядов, пядениц, лугового мотылька и др.

Бацитурин рекомендуется: для защиты картофеля от колорадского жука; овощных культур защищенного грунта от паутинного клеща и бахчевой тли.