

УДК 577.112

А.К. ГУЛЕВСКИЙ, Л.И. РЕЛИНА*

Антифризные белки.

Сообщение II. Распространение в природе

UDC 577.112

A.K. GULEVSKY, L.I. RELINA*

Antifreeze Proteins.

Report II. Occurrence in Nature

В работе обобщены многочисленные данные о распространении антифризных белков в природе. Приведены основные принципы их классификации. Предложен вариант классификации антифризных протеинов в зависимости от таксономической принадлежности организмов, в которых они обнаружены.

Ключевые слова: антифризные белки, классификация, распространение в природе.

В роботі узагальнено численні дані щодо розповсюдження антифризних білків у природі. Наведено головні принципи їх класифікації. Запропоновано варіант класифікації антифризних протеїнів в залежності від таксономічної належності організмів, в яких вони були виявлені.

Ключові слова: антифризні білки, класифікація, розповсюдження у природі.

Multiple data on distribution of antifreeze proteins in nature are summarised in the paper. The main principles of their classification are presented. A variant of antifreeze protein classification depending on taxonomic categories of organisms, which they were found in, is proposed.

Key-words: antifreeze proteins, classification, occurrence in nature.

В современной литературе имеется множество сведений об антифризных протеинах (АФП), функция которых заключается в защите клеток от повреждающих факторов, связанных с риском кристаллизации жидкости организма при понижении температуры. АФП представляют собой многочисленную группу разнообразных белков, которых объединяют общие свойства: способность снижать температуру замерзания, не влияя при этом на температуру оттаивания; модифицировать или останавливать рост кристаллов льда; ингибировать рекристаллизацию и, возможно, защищать клеточные мембраны от повреждений. АФП найдены у позвоночных, беспозвоночных, у растений, бактерий и грибов [5].

Цель работы – попытка классификации разнообразных АФП в зависимости от их распространения в различных систематических группах.

I. Белки и гликопротеиды рыб

1. Антифризные гликопротеиды (АФГП)

Подробное описание АФГП рыб и предполагаемый механизм их действия даны в обзоре [1]. Все компоненты АФГП в принципе имеют одинаковое строение и состоят в основном из повторяющихся

In modern literature there is a huge information about antifreeze proteins (AFPs), which function consists in cell protection against damaging factors, related to the risk of organism's liquid crystallisation under temperature decrease. AFPs represent a numerous group of different proteins, having common properties such as: capability to decrease freezing temperature with no effect on that of thawing; modification or stop of ice crystal growth; recrystallisation inhibition and a possible protection of cell membranes against damages. AFPs were found in vertebrates, invertebrates, plants, bacteria and fungi [5].

Research aim was the attempt to classify the different AFPs depending on their distribution in various systematic groups.

I. Fish proteins and glycoproteins

1. Antifreeze glycoproteins (AFGPs)

Detailed description of fish AFGPs and their assumed effect mechanism are presented in the review [1]. Principally, all the AFGPs components have a similar structure and comprise mostly repeated glycoprotein links, based on Ala-Ala-Thr struc-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the
National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya
str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 4135, fax: +380 57
373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

гликотрипептидных звеньев на основе структуры Ala-Ala-Thr [12]. Дисахарид присоединен к каждому остатку треонина [60, 61]. Число гликотрипептидных звеньев определяет разницу молекулярной массы компонентов, которые принято нумеровать в порядке её уменьшения [11, 20]. Фракции АФГП 1–5 – это полимеры с молекулярной массой 11–32 кДа, содержащие от 17 до 50 звеньев. Молекулярная масса компонентов АФГП 6–8 составляет 2,6–8 кДа, они содержат 4–12 звеньев. АФГП 6–8, в отличие от АФГП 1–5, имеют в своем составе остатки пролина, причем в одном звене не может быть больше одного остатка пролина [43]. Гидрофильные участки молекул АФГП способны конкурировать с молекулами воды за образование водородных связей в гексагональной решетке зародышевых кристаллов льда [21, 57]. Поскольку расстояние между гидроксильными группами соседних атомов углерода в гексапиранозном кольце углеводных остатков галактозы совпадает с расстоянием между соседними молекулами воды вдоль кристаллографической оси *a* льда, вполне допустимо, что каждый остаток галактозы связывает две молекулы воды, т.е. вдоль оси *a* не остается вакантных молекул воды. Предположение о роли углеводных цепей АФГП с многочисленными гидроксильными группами в процессе адсорбции АФГП на поверхности зародышевых кристаллов подтверждается также опытами по химической модификации дисахаридных составляющих [40, 60, 61, 65]. Периодатное окисление и ацетилирование ОН-групп приводят к инактивации молекул АФГП, что свидетельствует о наличии “активных центров” на дисахаридных фрагментах боковых цепей. Поскольку дисахарид, являясь жестким звеном, имеет ограниченную возможность ротационных флуктуаций вокруг О-гликозилпептидной связи, можно предположить, что пептидная цепь служит для определенной ориентации боковым дисахаридным звеньям, т.е. для формирования специфической активной конформации АФГП [57].

Искусственно синтезированный аналог АФГП 8 в растворах формирует агрегаты из димеров [7]. При невысоких концентрациях предпочтительная конформация АФГП 8 в растворе представляет собой “случайный” виток, однако при повышении концентрации спектры кругового дихроизма показывают появление α -спиралей и β -слоев, что свидетельствует о высокой лабильности этих компонентов в растворе. Термогистерезисная активность в растворах с агрегатами намного выше, чем в растворах с низкими концентрациями АФГП 8, не содержащими агрегатов, что подтверждает кооперативный характер функционирования низкомолекулярных АФГП; этот факт был ранее установлен при исследовании взаимодействия крупных и малых АФГП [1].

ture [12]. Disaccharide joins each threonine residue [60, 61]. The number of glycotriptide links determines a difference between molecular mass of components, admitted for enumeration in order of its decreasing [11, 20]. AFGPs 1–5 fractions are polymers with 11–32 kDa molecular mass, comprising from 17 to 50 links. Molecular mass of AFGPs 6–8 components is 2.6–8 kDa, they consist of 4–12 links. AFGPs 6–8, in contrast to AFGPs 1–5, have in their content proline residues, moreover one link can not contain more than one proline residue [43]. Hydrophilic sites of AFGPs molecules are capable to compete with water molecules for hydrogen bond formation in hexagonal latitude of ice embryonic crystals [21, 57]. Since the distance between hydroxyl groups of carbon adjacent atoms in hexopyranose ring of galactose carbohydrate residues coincides with that between water neighbouring molecules along ice crystallographic axis *a*, it is quite allowable, that each galactose residue binds two water molecules, *i. e.* no vacant water molecules remain along the axis *a*. This assumption about the role of AFGPs carbohydrate chains with numerous hydroxyl groups during AFGPs adsorption on embryonic crystal surface is also approved by the trials on chemical modification of disaccharide components [40, 60, 61, 65]. Periodate oxidation and OH-group acetylation result in AFGP molecule inactivation, testifying to the presence of “active centers” on disaccharide fragments of lateral chains. Since the disaccharide, being a hard link, possesses a limited possibility for rotational fluctuations around O-glycosyl peptide bond, we may assume a peptide chain to serve as the certain orientation for lateral disaccharide links, *i. e.* to form a specific active AFGP conformation [57].

Artificially synthesised AFGP 8 analogue in solutions forms aggregates from dimers [7]. Under low concentrations a preferable AFGP 8 conformation in solution is a “random” turn, but under concentration rise the spectra of circular dichroism show the appearance of α -helix and β -layers, that testifies to a high lability of these components in solution. Thermohysteresis activity in solutions with aggregates is much higher, than in those with low concentrated AFGP 8 and free of aggregates, that confirms a cooperative character of low molecular AFGPs functioning; this fact was previously established when investigating the interaction between large and small AFGPs [1].

2. Antifreeze proteins (AFPs)

AFPs are characterised by various polypeptide chain length and amino acid composition. Three groups of AFPs are distinguished:

2. Антифризные протеины (АФП)

АФП имеют разнообразную длину полипептидной цепи и аминокислотный состав. Выделяют три типа АФП:

2.1. *Type I*. Богатые аланином α -спиральные белки с молекулярной массой 3–4 кДа, найденные впервые у керчаков и камбал [3, 32]. В пределах этого класса АФП принято выделять 2 подкласса: *a* – белки, родственные АФП I зимней камбалы, которые содержат повторы из 11 аминокислотных остатков, начинающиеся с треонина; *b* – белки, родственные АФП I керчаков. Они уникальны тем, что α -спираль N-концевого участка прерывиста, а повторы из 11 аминокислотных остатков, характерных для других АФП I, у них меньше [31].

Практически все исследования были направлены на изучение подкласса *a*. Это молекулы, состоящие из 37 аминокислотных остатков, имеющие стержневидную форму и практически полностью α -спиральные. Анализ аминокислотной последовательности этих АФП показывает, что полярные остатки аспарагина и аргинина находятся в кластерах, разделенных последовательностью из 5–7 неполярных остатков – преимущественно аланинов [1]. Если предположить, что молекула АФП полностью α -спиральна, расстояние между полярными остатками треонина и аспарагина или лизина в тетрапептидных кластерах будет составлять 4,5Å. При этом боковые цепи полярных остатков проецируются с одной стороны α -спирали, а неполярных – с другой. Такая сегрегация полярных и неполярных групп приводит к увеличению амфифильности. Предполагалось, что образование водородных связей между боковыми цепями полярных остатков (гидроксильных групп треонина) АФП и атомами кислорода на поверхности зародышевых кристаллов льда может привести к их адсорбции вдоль оси преимущественного роста. Однако замена аланинов на другие аминокислоты приводит к потере антифризной активности, тогда как замена на гидрофильную сторону такого эффекта не имеет [4]. Это свидетельствует о взаимодействии со льдом консервативной аланиновой поверхности спирали и о важности гидрофобных взаимодействий при связывании со льдом [8, 35]. Лизины на гидрофильной стороне могут обеспечивать растворимость белка, а кэп-структура на N-конце, вероятно, помогает стабилизировать спираль. Эти предположения подтверждены и более поздними исследованиями 50 мутантных белков подкласса *a* [31]. Установлено, что для термостерезисной активности необходимы следующие условия: 1) высокое содержание аланиновых остатков, обеспечивающее спиральную конформацию; 2) гидрофобная поверхность, взаимодействующая с поверхностью кристалла; 3) наличие заряженных полярных аминокислотных остатков, ответственных

2.1. *Type I*. Rich of alanine α -helical proteins with 3–4 kDa molecular mass, found first in sculpins and flounders [3, 32]. Within this AFPs class one emphasises 2 subclasses: *a* – proteins, related to AFPs I of winter flounders, containing repeats from 11 aminoacid residues, starting from treonin; *b* – proteins, related to sculpins AFPs I. They are unique by a discontinuous α -helix of N-terminal site and a less number of repeats from 11 aminoacid residues, typical for other AFPs I [31].

Practically all trials were oriented to study the subclass *a*. These are the molecules, consisting of 37 aminoacid residues, with rod-like shape and almost all α -helical ones. The analysis of aminoacid sequence of these AFPs demonstrates polar residues of asparagine and arginine to be in clusters, divided by the sequence of 5–7 non-polar residues: mostly alanines [1]. If assuming the AFPs to be completely helical, the distance between polar residues of threonine and asparagine or lysine in tetrapeptide clusters will be 4.5Å. At the same time the lateral chains of polar residues are projected to one side of α -helical and non-polar ones to another. Such a segregation of polar and non-polar groups results in amphiphility augmentation. Formation of hydrogen bonds between lateral chains of polar residues (threonine hydroxyls) of AFPs and oxygen atoms on the surface of ice embryonic crystals was assumed as capable to results in their adsorption along the primary growth axis. However the substitution of alanines for other aminoacids results in a loss of antifreeze activity, meanwhile the one on hydrophilic side has not such an effect [4]. This testifies to the interaction of conservative alanine helical surface with ice and to the importance of hydrophobic interactions when binding with ice [8, 35]. Lysines on a hydrophilic side may provide the protein solubility, but the cap-structure on N-terminal probably assists in a helical stabilisation. These assumptions are confirmed by later research in 50 mutant proteins of subclass *a* [31]. The following conditions were established to be necessary for thermohysteresis activity: 1) high content of alanine residues, providing a helical conformation; 2) hydrophobic surface, interacting with crystal surface; 3) the presence of charged polar aminoacid residues, responsible for solubility and/or interaction with ice lattice; 4) minimum chain length in 25 aminoacid residues.

The winter flounder AFPs I are bound with 12 faces of bipyramidal crystal, meanwhile the sculpin AFPs I are done only with 6 ones [31]. Molecular nature of differences in specific binding with ice embryonic crystals of AFPs I subclasses *a* and *b* has still remained unstudied, although there were

за растворимость и/или взаимодействие с решеткой льда; 4) минимальная длина цепочки в 25 аминокислотных остатков.

АФП I зимней камбалы связываются с 12 гранями бипирамидального кристалла, тогда как АФП I керчаков связываются только с 6 гранями [31]. Молекулярная природа различий в специфичности связывания с зародышевыми кристаллами льда АФП I подклассов *a* и *b* пока не исследована, хотя обнаружены явные различия в структуре N-концевого участка. Однако ясно, что все АФП I обладают гидрофобной поверхностью, которая ориентирована в направлении границы лёд/вода и необходима для проявления антифризной активности [18].

2.2. *Тип II*. Богатые цистеином лектиноподобные глобулярные белки атлантической волостатки (морской ворон), атлантической сельди и американской корюшки [47]. АФП II демонстрируют термогистерезис $0,13^{\circ}\text{C}$; они связываются с бипирамидальными кристаллами льда и способны ингибировать рекристаллизацию [16, 71]. Предшественник АФП II волостатки синтезируется в печени и состоит из 163 аминокислот [15]. Далее он превращается в промежуточную форму из 146 аминокислот (16 кДа), которая хранится в печени, а затем созревает в активный АФП из 129 аминокислот (14 кДа) вскоре после высвобождения в кровяное русло. Для ингибирования роста льда для белков этого класса, выделенных из тканей сельди и корюшки, необходимы ионы Ca^{2+} в качестве кофактора, тогда как аналогичный белок волостатки способен связываться со льдом в отсутствие Ca^{2+} , что подтверждается экспериментами по сайт-направленному мутагенезу [47]. Даже обширные мутации в области Ca^{2+} -связывающего сайта приводят лишь к 25%-й потере антифризной активности АФП II волостатки. Этот белок содержит только 2 Ca^{2+} -связывающих сайта, в то время как АФП II сельди и корюшки – 5 Ca^{2+} -связывающих сайтов (как и молекула лектина). Исследования по сайт-направленному мутагенезу АФП II сельди показали, что связывающий лёд сайт содержит 2 треонина в положениях 96 и 98 и аспарагин с глутамином в положениях 94 и 99 соответственно. Два последних регулируют связывание Ca^{2+} [46]. Именно этот участок инициирует адсорбцию молекулы белка на призматической поверхности кристалла льда. АФП II сельди специфичен в отношении Ca^{2+} , так как при связывании других двухвалентных ионов (Zn^{2+} и Ba^{2+}) резко снижалась антифризная активность и изменялась морфология кристаллов льда [17].

Третичная структура АФП II также сходна с третичной структурой лектинов и содержит 2 α -спирали, 2 β -складчатых слоя; значительная доля аминокислот приходится на петли и повороты [63].

found out the distinct differences in the N-terminal site structure. However it is evident, that the all AFPs I possess a hydrophobic surface, oriented towards ice/water boundary and necessary for antifreeze activity manifestation [18].

2.2. *Type II*. Cysteine-rich lectin-like globular protein of Atlantic big-mouthed sculpin (sea raven), Atlantic herring and American smelt [47]. AFPs II demonstrate thermohysteresis 0.13°C ; they are bound with bipyramidal ice crystals and capable for recrystallisation inhibition [16, 71]. Big-mouthed sculpin AFPs II precursor is synthesised in liver and consists of 163 aminoacids [15]. Further it transforms into an intermediate form, consisting of 146 aminoacids (16 kDa), being stored in liver, with following maturation in an active AFP of 129 aminoacids (14 kDa) just after releasing into a blood channel. For ice growth inhibiting for this class proteins, isolated from herring and smelt tissue, the Ca^{2+} ions are necessary as a cofactor, meanwhile a similar protein of big-mouthed sculpin is capable to bind with ice when Ca^{2+} is absent, that is confirmed by the experiments on site-directed mutagenesis [47]. Even numerous mutations in Ca^{2+} -binding site area result only in 25% loss of antifreeze activity of big-mouthed sculpin's AFPs II. This protein contains only 2 Ca^{2+} -binding sites, meanwhile there are 5 ones in AFPs II of herring and big-mouthed (as well as in lectin molecule). Studies on a site-directed mutagenesis of herring AFPs II demonstrated a binding ice to comprise 2 threonines in 96 and 98 positions and asparagine with glutamine in 94 and 99 ones, correspondingly. Two latter ones regulate Ca^{2+} binding [46]. Namely this site initiates adsorption of protein molecule on a prismatic surface of ice crystal. Herring's AFP II is specific in respect of Ca^{2+} , meanwhile during binding of other bivalent ions (Zn^{2+} and Ba^{2+}), an antifreeze activity sharply decreased and ice crystal morphology changed [17].

Tertiary structure of AFPs II is also similar with that of lectin and comprises 2 α -helices, 2 β -sheets; a significant part of aminoacids falls on loops and turns [63]. Tertiary structure is stabilised with 5 disulphide bridges. AFP II of American smelt *Osmerus mordax* is dimer, consisting of 2 separate subunits and comprising oligosaccharide, which function has still remained unclear, because of its not-being in dimerisation and no effect on antifreeze activity and protease resistance [2].

Of interest is the fact, that AFPs II were identified in body fluids in Japanese smelt, being fresh-water species from mid-latitudes [73]. This is a first report about the AFPs presence in fresh-water fish of moderate climate. This protein N-terminal

Третичная структура стабилизирована 5 дисульфидными мостиками. АФП II американской корюшки *Osmerus mordax* является димером, состоящим из 2-х отдельных субъединиц, и содержит олигосахарид, функция которого пока не выяснена, т.к. он не принимает участия в димеризации, не влияет на антифризную активность и устойчивость к протеазам [2].

Вызывает интерес то, что АФП II был идентифицирован в жидкостях тела у японской корюшки, которая является пресноводным видом из средних широт [73]. Это первое сообщение о наличии АФП у пресноводных рыб умеренного климата. N-концевая аминокислотная последовательность этого белка на 75% гомологична АФП II сельди, молекулярная масса 16,8 кДа. Ген, кодирующий АФП II японской корюшки, состоит из 444 тысяч пар нуклеотидов и на 85% идентичен гену АФП II сельди.

2.3. *Type III*. Белки, обнаруженные у американской бельдюги [66], содержат 3 основных и 5 минорных компонентов. Это семейство кодируется более чем 40 генами, что гарантирует высокое содержание АФП III в крови бельдюги [67]. Основные компоненты RD1 и RD2 содержат 64 аминокислотных остатка и имеют молекулярную массу 7 кДа. В RD1 обнаружен компактный глобулярный домен с 2 внутренними тандемными участками [39]. Каждый участок имеет форму “кренделя” и включает 4 коротких β -тяжа и 3_{10} -спираль. Он имеет внутреннюю полость, окруженную 8 консервативными неполярными аминокислотными остатками. RD3 состоит из 134 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 14 кДа [66]. В его структуре выделяют N-концевую последовательность длиной 64 аминокислотных остатка и C-концевую последовательность длиной 61 аминокислотный остаток. Эти участки соединены линкерной последовательностью из 9 аминокислотных остатков. N-концевая последовательность и C-концевая последовательность гомологичны друг другу и АФП III с молекулярной массой 7 кДа. N-домен имеет глобулярную форму, содержащую 6 β -тяжей, 3 поворота III типа и несколько петель, которые стабилизируют плоскую поверхность на одной из сторон домена, связывающуюся со льдом [50]. На этой поверхности расположено 5 атомов, которые образуют водородные связи и комплементарно подходят к 2 рядам атомов кислорода на призматической поверхности кристалла [36]. Предполагают, что АФП III связываются с призматической поверхностью, закрывая при этом базальную поверхность. Поверхность лёд-связывающего сайта необычно плоская для такой небольшой белковой молекулы [10]. В этом случае аминокислотные остатки должны быть очень плотно “упакованы”. Создано 6 мутантных форм белка, в которых консервативные аланины из центра плоской поверхности были заменены на более крупные остатки цистеина, треонина,

aminoacid sequence is 75% homologous of herring's AFPs II, 16.8 kDa molecular mass. The gene, coding Japanese smelt's AFPs II, consists of 444 thousand base pairs and is 85% identical to that of herring's ones.

2.3. *Type III*. Proteins, found in eel pout [66]. They comprise 3 main and 5 minor components. This family is encoded by more than 40 genes, providing a high AFP III content in eel pout's blood [67]. Main components RD1 and RD2 include 64 aminoacid residues and have 7 kDa molecular mass. Compact globular domain with 2 internal tandem sites was revealed in RD1 [39]. Each site is “pretzel”-like folded and includes 4 short β -strands and 3_{10} -helix. It has an internal cavity, surrounded with 8 conservative non-polar aminoacid residues. RD3 consists of 134 aminoacid residues and has 14 kDa molecular mass [66]. In its structure one isolates the N- and C-terminal sequences with 64 and 61 aminoacid residue lengths, correspondingly. These sites are bound with a linker sequence of 9 aminoacid residues. N- and C-terminal sequences are homologous to each other and to 7 kDa AFPs III. N-domain is of globular shape, containing 6 β -cords, 3 turns of type III and some loops, stabilising a flat surface on one of the domain sides, binding with ice [50]. On this surface there are 5 atoms, forming hydrogen bonds and complementary going with 2 oxygen atom series on crystal prismatic surface [36]. One believes, that AFPs III are bound with prismatic surface, thereby shielding a basal surface. The surface of ice-binding site is unusually flat for such a small protein molecule [10]. In this case the aminoacid residues should be very densely “packed” [10]. There were created 6 mutant protein forms, where conservative alanines from the center of a flat surface were substituted for larger residues of cysteine, threonine, methionine, arginine, histidine and tyrosine. Alanine substitution in position 16 for histidine or tyrosine results in a practically complete loss of antifreeze activity, due to a probable masking/shielding by large residues of aminoacid-“substituents” of glutamine in position 44, which is considered as ice-binding one. In addition, a steric disorder in ice-binding site results in a spatial change of residues' tight package on a flat surface. It is surprising, that one of the mutant proteins partially preserved its antifreeze activity. One believes this fact may be explained by AFPs capability for an active site formation on ice surface, which they are binding to. Linker sequence is approximately 60° angled, that possibly enables to orientate 2 ice-bound sites in N- and C-domains in such a way that they can interact simultaneously with crystal surface [50]. Ice-binding is considered to occur in 2 stages: 1) surface “probing”, for which

метионина, аргинина, гистидина и тирозина. Замена аланина в положении 16 на гистидин или тирозин приводила к практически полной потере антифризной активности, вероятно, за счет экранирования крупными остатками аминокислот-“заместителей” глутамина в положении 44, который, как считают, связывается со льдом. Кроме того, стерическое нарушение лёд-связывающего сайта ведет к пространственному изменению тесной упаковки остатков на плоской поверхности. Удивительно, что один из мутантных белков частично сохранял антифризную активность. Предполагают, что это может объясняться способностью АФП активно формировать сайт на поверхности льда, с которым они связываются. Линкерная последовательность изогнута под углом приблизительно 60° , что, возможно, позволяет ориентировать 2 связывающихся со льдом сайта в N- и C-доменах таким образом, что они могут одновременно взаимодействовать с поверхностью кристалла [50]. Считают, что связывание со льдом происходит в 2 этапа: 1) “прощупывание” поверхности, за которое ответственны участки цепи, образующие водородные связи; 2) установление Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий между остальными аминокислотными остатками связывающегося со льдом сайта и кристаллом, что увеличивает силу связи белок-лёд [24]. Однако позднее были получены результаты, доказывающие, что активность RD3 не зависит от линкерной последовательности [33]. Был создан белок с модифицированным линкером, характеристики которого существенно отличались от оригинального линкера. Новый линкер обладал гораздо большей подвижностью и вследствие этого оба домена двигались независимо друг от друга. Тем не менее термогистерезисная активность белка оставалась на прежнем уровне.

Синтезированы также искусственные мультимеры АФП III [53]. Термогистерезис возрастает пропорционально размеру мультимеров: чем больше мультимеры, тем при меньшей концентрации проявляется их максимальная активность. При этом каждый мультимер придает кристаллу льда уникальную форму, которая похожа, но не идентична изначальной бипирамидальной форме.

В зависимости от концентрации АФП III могут взаимодействовать либо с чужеродными частицами, либо с зародышевыми кристаллами льда [13].

2.4. Гиперактивный АФП. Его молекулярная масса 16,7 кДа, он выделен из плазмы крови камбалы [48]. Известные АФП не могут обеспечить нужную степень и стабильность переохлаждения в ледяной воде. Новый белок стабилен при низкой температуре и необратимо денатурирует при комнатной, что, возможно, мешало его более ранней идентификации. Этот белок, как и АФП, почти полностью α -спирален, имеет вытянутую форму и бо-

responsible are the chain sites, forming hydrogen bond and 2) establishment of van der Waals interactions between the rest aminoacid residues of ice-binding site and crystal, that increases strength of protein-ice bond [24]. However, later there were obtained the results, proving RD3 activity as independent on linker sequence [33]. Protein with a modified linker, the characteristics of which were significantly different from an original linker, has been designed. New linker had much higher motility, due to that both domains moved independently on each other. However a thermohysteresis activity of protein remained at a previous level.

Artificial multimers of AFPs III were synthesized as well [53]. Thermohysteresis increases proportionally to multimer size: the bigger multimers are, the lower is concentration, when their maximal activity manifests. At the same time each multimer forms an ice crystal into an unique shape, looks like an initial bipyramidal one, but not identical.

Depending on concentration the AFPs III may interact either with dust particles or embryonic ice crystals [13].

2.4. Hyperactive AFP. Its molecular mass is 16.7 kDa and it is isolated from flounder's blood plasma [48]. The known AFPs can not provide a proper degree and stability of overcooling in ice water. New protein is stable at a low temperature and irreversibly denatures at a room one, that, possibly, complicated its earlier identification. This protein as well as AFP I is almost completely α -helix, is elongated and alanine makes more than 60% of aminoacid residues in it. However in contrast to AFPs I (which molecular mass is 3-4 kDa) it is much bigger and forms dimer [29]. Its thermohysteresis activity is equal to that of insect AFPs.

II. Insect proteins

Insect proteins are much more active compared to fish and plant AFPs, which are characterised below. Thermohysteresis value for AFPs from *Tenebrio molitor* beetle hemolymph is 2.5°C at 1 mg/ml concentration, meanwhile thermohysteresis of most fish AFPs does not exceed 1.5°C at 10–20 mg/ml concentration [44]. So, insect AFPs may be also referred to hyperactive ones.

AFP's concentration may considerably vary in the same species. For example, *Cucujus clavipes* beetles from North Carolina in winter have much lower AFPs concentration compared to representatives of the same species from Alaska due to a sharp dehydration of insect's tissues, but not a rise in AFPs absolute number [6].

Thermohysteresis effect was first found out in the yellow mealworm *T. molitor*. AFPs of *T. molitor*

лее 60% аминокислотных остатков в нем составляет аланин. Но в отличие от АФП I (молекулярная масса которых 3–4 кДа) он гораздо больше и формирует димер [29]. Его термогистерезисная активность сравнима с таковой АФП насекомых.

II. Белки насекомых

АФП насекомых значительно более активны по сравнению с АФП рыб и растений, характеристика которых приведена ниже. Величина термогистерезиса для АФП из гемолимфы большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* составляет 2,5°C при концентрации 1 мг/мл, тогда как термогистерезис большинства АФП рыб не превышает 1,5°C при концентрации 10–20 мг/мл [44]. Таким образом, АФП насекомых также можно отнести к гиперактивным.

У одного и того же вида может значительно варьировать концентрация АФП. Например, жуки *Cisujus clavipes* из Северной Каролины зимой имеют гораздо более низкие концентрации АФП по сравнению с представителями того же вида из Аляски за счет резкой дегидратации тканей насекомых, но не увеличения абсолютного количества АФП [6].

Впервые эффект термогистерезиса был обнаружен у *T. molitor*. АФП *T. molitor* содержат меньшее число остатков гидрофобных аминокислот по сравнению с антифризами рыб, что может иметь важное биологическое значение. В соответствии с теорией Zettlemoyer [76] одиночные гидрофильные сайты, расположенные в обширном гидрофобном матриксе, служат как инициаторы нуклеации, поэтому при достаточно низких температурах АФП могли бы действовать как нуклеирующие агенты. Рыбы не обитают в воде при температуре ниже точки замерзания морской воды (–1,9°C), так что для них это не играет роли. Относительно насекомых ситуация совершенно иная. В этом случае АФП сыграли бы скорее пагубную роль, чем защитную. Поэтому меньшая гидрофобность белков *T. molitor* может иметь существенное значение.

У *T. molitor* обнаружено 11 АФП [54]. Один из представителей этого семейства чрезвычайно активный АФП с молекулярной массой 8,5 кДа [44]. Он богат треонином и содержит 16 остатков цистеина, которые все вовлечены в образование дисульфидных мостиков. Методами ЯМР и КД установлено, что этот белок имеет третичную структуру в виде β-спирали на основе повторов из 12 аминокислотных остатков. Треониновые и цистеиновые остатки, организованные в повторяющийся мотив треонин-цистеин-треонин, образуют участок плоского β-сложенного слоя. Благодаря расположению треонинов, расстояние между группами ОН в этом локусе идеально соответствует пространственной решетке льда. Поэтому логично предположить, что именно он ответственен за связывание со льдом. Это

contain less number of hydrophobic amino acid residues compared to fish antifreezes, that may be of great importance for biology. According to the theory of Zettlemoyer [76] the single hydrophilic sites, located in a wide hydrophobic matrix serve as nucleation initiators, therefore AFPs might act as nucleating agents under quite low temperatures. Fish species do not live in water at the temperature lower than freezing point for sea water (–1.9°C), so this has no importance for them. As for insects the situation is quite different. In this case AFPs might play rather harmful role, than a protective one. Therefore a lower hydrophobicity of *T. molitor* proteins may be essential.

In *T. molitor* there were revealed 11 AFPs [54]. One of this family representatives is extremely active AFP with 8.5 kDa molecular mass [44]. It is rich of threonine and comprises 16 cysteine residues, involved into disulphide bridge formation. Using the NMR and CD methods the authors established this protein as having a β-helical tertiary structure, based on 12 amino acid residual repeats. Threonine and cysteine residues, organised in the threonine-cysteine-threonine repeating motif, form a flat β-sheet site. Due to threonine location the distance between HO groups in this locus ideally corresponds to a spatial ice lattice. Therefore of logic is to assume it to be responsible for ice-binding. This is confirmed by the data, that steric changes in this site result in a loss of antifreeze activity [49].

Purified AFP from spruce bud worm *Choristoneura fumiferana* has 9 kDa mass and represents a β-helix with 15 amino acid residues per turn [25, 27]. β-helices have cross sections and form parallel β-layers: the chain architecture, not met in fish. The ice-binding side comprises 9 threonines, organised in a repeating motif, being complementary to ice lattice on both prismatic and basal surfaces. Binding of such an AFP with both surfaces may explain an extremely high activity of insect AFPs.

In *Dendroides canadensis* beetle larvae there were identified 12 AFPs, 4 of them are in hemolymph, the rest ones are localised in epithelial cells, fat body and midgut [14, 68]. The efficiency of AFPs functioning depends on their interaction, that resembles a cooperative functioning of fish antifreezes. Research in this family representatives demonstrated glycerol as increasing AFP activity, by stimulating interaction between AFP molecules, because under glycerol adding into the solution, containing only one AFPs type, no effect was obtained.

AFPs with 6.5 and 15.7 kDa molecular mass, rich with glycine, making 45% residues, have been revealed in snow flea [28]. Lesser AFP consists

подтверждается данными о том, что стерические изменения в этом участке ведут к потере антифризной активности [49].

Очищенный АФП из гусеницы листовёртки-почкоеда елового *Choristoneura fumiferana* имеет массу 9 кДа и представляет собой β -спираль с 15 аминокислотными остатками на виток [25, 27]. β -спирали имеют поперечные секции и формируют параллельные β -слои – форма укладки, не встречающаяся у рыб. Сторона, связывающаяся со льдом, содержит 9 треонинов, которые организованы в повторяющийся мотив, комплементарный решетке льда, на призматической и базальной поверхностях. Связывание такого АФП с обеими поверхностями может объяснить чрезвычайно высокую активность АФП насекомых.

У личинок жука *Dendroides canadensis* идентифицировано 13 АФП, 4 из них находятся в гемолимфе, а остальные локализуются в клетках эпителия, жировом теле и среднем кишечнике [14, 68]. Эффективность функционирования АФП зависит от их взаимодействия друг с другом, что напоминает о кооперативном функционировании антифризов рыб. Исследования на представителях этого семейства показали, что глицерол повышает активность АФП, стимулируя взаимодействия между молекулами АФП, так как при добавлении глицерола в раствор, содержащий только один вид АФП, никакого эффекта получено не было.

У снежной блохи обнаружены АФП с молекулярной массой 6,5 и 15,7 кДа, богатые глицином, который составляет 45% остатков [28]. Меньший АФП состоит из трипептидных повторов, первым аминокислотным остатком в которых обязательно является глицин. Эта особенность отличает эти белки от других АФП насекомых, предполагая независимую эволюцию адаптаций. Согласно предложенной модели [42] полипептидная цепочка, состоящая из 81 аминокислотного остатка, образует 6 коротких полипролиновых спиралей II типа, соединенных поворотами, также содержащими пролин. Эта структура формирует 2 слоя, каждый из 3-х спиральных участков ориентирован антипараллельно. Центральные спирали содержат глицин. Структура стабилизирована дисульфидными мостиками. Такая белковая молекула является амфипатичной, что характерно для АФП в целом, и, предположительно, связывается со льдом своей гидрофобной поверхностью.

III. Белки нематод

У антарктической нематоды *Panagrolaimus davidi* обнаружен белок с ингибирующей рекристаллизационной активностью, но не вызывающий термостерезис [69]. Такие белки обнаруживают у устойчивых к заморзанию организмов. Этот белок может быть

of tripeptide repeats, where glycine is obligatory the first aminoacid residue. This peculiarity distinguishes these proteins among other insect AFPs, suggesting an independent evolution of adaptations. According to the proposed model [42] a polypeptide chain, consisting of 81 aminoacid residues, forms 6 short polyproline helices of II type, bound by proline-containing turns as well. This structure forms 2 layers, each of 3-helical sites is oriented in antiparallel way. Central helices contain glycine. Structure is stabilised by disulphide bridges. Such a protein molecule is amphipatic, that is integrally typical for AFPs and presumably bound with ice by its hydrophobic surface.

III. Nematode proteins

Protein with recrystallisation inhibiting activity, but not causing thermohysteresis, was found out in Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* [69]. Such proteins were revealed in freezing-resistant organisms. This protein may be especially important in case of intracellular crystallisation, that may be survived by nematodes, because of its capability for ice stability control after its formation. Experimental thermograms demonstrate no thermic changes after freezing peak up to the moment of thawing [70].

IV. Plant proteins

1. Higher plant AFPs

AFP with 36 kDa molecular mass of carrot *Daucus carota*, isolated from root apoplast, is characterised by a high inhibiting activity in respect of recrystallisation and thermohysteresis activity [62]. This protein in solution is monomer and comprises a hydrocarbon part on N-terminal.

The AFP primary structure from *Lolium perenne* rye grass has been established [41]. This protein has a powerful inhibitor activity towards recrystallisation as well, but thereby being characterised with relatively low thermohysteresis values. This protein consists of 118 aminoacid residues and even if comprising a hydrocarbon part, the study of glycosylated and non-glycosylated forms testifies to the fact, that namely polypeptide backbone is bound with crystal. Theoretic model assumes the presence of domain with β -turns and 8 loops, containing of 14–15 aminoacids. Such a folding is provided by a conservative valine nucleus and internal asparagine ladder on both terminals of β -turn. Plant AFP is suggested to have 2 sites of ice-binding, located opposite to one another. They are complementary to ice prismatic surface. Such a location of 2 ice-binding sites explains low values of thermohysteresis and a high inhibiting activity

особенно важен в случае внутриклеточной кристаллизации, которую способны переживать нематоды, так как он может контролировать стабильность льда после его формирования. Экспериментальные термограммы показывают, что после пика замерзания не наблюдалось никаких термических изменений вплоть до момента оттаивания [70].

IV. Белки растений

1. АФП высших растений

АФП с молекулярной массой 36 кДа моркови *Daucus carota*, выделенный из апопласта корней, характеризуется высокой ингибирующей активностью в отношении рекристаллизации и термогистерезисной активностью [62]. Этот белок в растворе представляет собой мономер и содержит углеводную часть на N-конце.

Установлена первичная структура АФП из клевера *Lolium perenne* [41]. Этот белок также обладает мощной ингибиторной активностью в отношении рекристаллизации, но при этом характеризуется относительно низкими значениями термогистерезиса. Данный белок состоит из 118 аминокислотных остатков и хотя содержит углеводную часть, исследование гликозилированных и негликозилированных форм свидетельствует о том, что с кристаллом связывается полипептидный остов. Теоретическая модель предполагает наличие домена с β -витками и 8 петлями, состоящими из 14–15 аминокислот. Такое сворачивание обеспечивается консервативным валиновым ядром и внутренними аспарагиновыми лесенками на обоих концах β -витка. Предполагается, что растительный АФП имеет 2 сайта связывания со льдом, расположенных напротив друг друга. Они комплементарны призматической поверхности льда. Такое расположение 2-х связывающих лёд сайтов объясняет небольшое значение термогистерезиса и высокую ингибирующую активность процессов рекристаллизации льда при сравнении с АФП рыб и насекомых. Подтверждено, что АФП растений имеют множественные гидрофильные домены, связывающие лед [19, 30].

Известно, что АФП растений имеют также другую функцию: это внеклеточные белки, принимающие участие в ответе растений на инфекцию. Такие белки называют глюканазами и они ингибируют ферменты патогенов, разрушающие стенки растительных клеток [37]. Для них характерны богатые лейцином повторы [75]. Заряженные аминокислотные остатки в лёд-связывающем сайте глюконаз озимой ржи *Secale cereale* высоко консервативны, при этом глюконаза из неакклиматизированной ржи содержала лишь один заряженный остаток аминокислоты в этом сайте [72]. АФП ржи формируют олигомерные комплексы, которые резко увеличивают их антифризную активность [74], возможно, за счет

of ice recrystallisation processes compared to fish and insect AFPs. Plant AFPs are proved to have the numerous hydrophilic ice-binding domains [19, 30].

Plant AFPs are known to have another function: these are extracellular proteins, participating in plant response to infection. Such proteins are called gluconases, they inhibit pathogen enzymes, destroying plant cell walls [37]. They are characterised by lecithin-rich repeats [75]. Charged aminoacid residues in ice-binding site of gluconase of winter rye *Secale cereale* are highly conservative, nevertheless the gluconase from unacclimatised rye contained only one charged aminoacid residue in this site [72]. Rye AFPs form oligomer complexes, sharply increasing their antifreeze activity [74], possibly, due to more extended ice-interacting surfaces. In wheat *Triticum aestivum* there were found out 2 genes, encoding untypical for plant AFPs [64]. In contrast to the known AFPs, they have a N-terminal site, homologous to lecithin-rich repeating areas of protein kinase receptor domain and C-terminal site, homologous to a domain, binding ice of some AFPs.

2. Algae proteins

Antarctic sea diatom algae produce into environment the compounds, capable for ice-binding [58]. These compounds inhibit recrystallisation and “freeze into” ice lattice during freezing.

V. Mould proteins

In 3 species of snow mold *Coprinus psychromorbidus*, *Myriosclerotinia borealis* and *Typhula incarnata* there was found out a small protein, homologous to flounder AFPs [52]. It has an antifreeze activity and may be bound with membranes. Possibly, it possesses an additional protective function towards membranes, besides an antifreeze one, that suggests the presence of interaction mechanism with membranes, distinct from that of embryonic ice crystal binding.

VI. Bacterial proteins

AFP with a high activity was found out in Antarctic bacteria *Marinomonas primoryensis* [23]. For antifreeze activity manifestation this protein needs Ca^{2+} ; its activity is of cooperative character. It may reduce freezing temperature by 2°C in 0.5 mg/ml concentration, therefore it may be referred to hyperactive ones. However, in contrast to the standard AFPs there is no evidence of this protein binding with ice crystal surface within a thermohysteresis interval. It is extremely big: more than 1 MDa. Proposed model of this protein tertiary structure suggests the β -helix, one side of

более обширных поверхностей, взаимодействующих со льдом. У пшеницы *Triticum aestivum* обнаружили 2 гена, которые кодируют необычные для растений АФП [64]. В отличие от уже известных АФП, они имеют N-концевой участок, гомологичный лейцин-богатым повторяющимся областям рецепторного домена протеинкиназ и C-концевой участок, который гомологичен домену, связывающему лед некоторых АФП.

2. Белки водорослей

Антарктические морские диатомовые водоросли также продуцируют во внешнюю среду соединения, способные связываться со льдом [58]. Эти соединения ингибируют рекристаллизацию, а при замораживании “вмерзают” в решетку льда.

V. Белки плесневых грибов

У 3-х видов снежной плесени *Coprinus psychromorbidus*, *Myriosclerotinia borealis* и *Typhula incarnata* обнаружен небольшой белок, гомологичный АФП камбалы [52]. Он обладает антифризной активностью и способен связываться с мембранами. Возможно, он имеет дополнительную защитную функцию по отношению к мембранам, помимо антифризной, что предполагает наличие механизма взаимодействия с мембранами, отличного от механизма связывания с зародышевыми кристаллами льда.

VI. Белки бактерий

АФП с высокой активностью был найден у антарктической бактерии *Marinomonas primoryensis* [23]. Для проявления антифризной активности этому белку необходим Ca^{2+} ; активность его имеет кооперативный характер. Он способен снижать температуру замерзания на 2°C в концентрации $0,5 \text{ мг/мл}$ и, следовательно, его можно отнести к гиперактивным. Однако в отличие от классических АФП не существует доказательств связывания данного белка с поверхностью кристаллов льда в термогистерезисном промежутке. Он необычайно велик – более 1 МДа. Предложенная модель третичной структуры этого белка предполагает β -спираль, одна сторона которой связывает ионы Ca^{2+} , расположенные в один ряд, а другая – содержит гидрофобные остатки аминокислот [22]. Рядом с Ca^{2+} -связывающим участком находится связывающаяся со льдом поверхность, которая состоит из параллельных повторов остатков треонина и аспарагина. Следует отметить, что это первый из бактериальных АФП, охарактеризованный достаточно детально, и один из пяти гиперактивных АФП, идентифицированных на данный момент.

Во внутриклеточном пространстве антарктической бактерии *Flavobacterium xanthum* был также выявлен белок с термогистерезисной и антирекри-

which binds Ca^{2+} ions placed in a row, but another contains the hydrophobic aminoacid residues [22]. Close to Ca^{2+} -binding site there is an ice-bound surface, consisting of parallel repeats of threonine and asparagine residues. Of note is the fact, that it is the first among bacterial AFPs, characterised in sufficient detail, and one of five hyperactive AFPs, presently identified.

Protein with thermohysteresis and anti-recrystallisation activity with 59 kDa molecular mass was also revealed in intracellular space of Antarctic bacteria *Flavobacterium xanthum* [38]. Antarctic sea bacteria *Colwellia* produces an extracellular protein with 25 kDa molecular mass, demonstrating the affinity with ice crystals. This protein consists of 253 aminoacid residues, its primary structure is homologous to the similar proteins from snow mold and diatom algae [56, 58]. This protein function is unknown in an extracellular space, but one suggests it to be the recrystallisation inhibitor in protecting bacterial membranes in a frozen state.

In addition, the gene, encoding an unusual protein, manifesting both nucleating and antifreeze activities, has been identified in rhizobacteria *Pseudomonas putida* [51]. This unusual protein is not investigated yet and has no place in protein classification, controlling ice crystal growth.

At initial stage of AFPs and AFGPs studying they were believed as quite a homogenous group of compounds of protein nature in spite of different origins. However with widening and deepening knowledge about biological antifreezes, the representatives of this group were established to have few number of common features. AFPs differ greatly in primary and secondary structures, efficient concentrations and ice crystal surfaces, to which they are bound. The question arises which should be the features to unite these proteins in one functional family. Or such a generalisation is artificial and caused by lack of our knowledge? For this purpose it is necessary to cite the features, by which these proteins are distinguished into a separate class [1, 9].

1. Biological antifreezes reduce freezing temperature in a non-colligative way, *i. e.* the dependency function of freezing temperature decrease of their solutions on concentrations is not direct, but similar to hyperbole with the plateau in AFP high concentration range, testifying the saturation effect. At the same time the AFPs reduce the freezing temperature of solutions in some hundreds times more efficiently, than other comparably sized macromolecules. When decreasing freezing temperature the antifreezes do not practically affect their melting temperature, as a consequence no balance between solid and liquid phases of antifreeze systems was

таллизационной активностью, имеющий молекулярную массу 59 кДа [38]. Антарктическая морская бактерия *Colwellia* продуцирует внеклеточный белок с молекулярной массой 25 кДа, который обнаруживает сродство к кристаллам льда. Данный белок состоит из 253 аминокислотных остатков, его первичная структура гомологична аналогичным белкам из снежной плесени и диатомовых водорослей [56, 58]. Функция этого белка во внеклеточном пространстве не известна, однако предполагают, что он может быть ингибитором рекристаллизации, защищая мембраны бактерий в замороженном состоянии.

Кроме того, у ризобактерии *Pseudomonas putida* был идентифицирован ген, который кодирует необычный белок, проявляющий нуклеирующую и антифризную активность [51]. Этот необычный белок не исследован и не имеет своего места в классификации белков, контролирующей рост кристаллов льда.

На начальном этапе изучения АФП и АФГП существовало мнение, что они, несмотря на различное происхождение, являются достаточно однородной группой соединений белковой природы. Однако по мере расширения и углубления знаний о биологических антифризах установлено, что у представителей этой группы мало общих признаков. АФП очень сильно отличаются по первичной и вторичной структуре, эффективным концентрациям и поверхностям кристаллов льда, с которыми они связываются. Возникает вопрос, по каким признакам можно объединить данные белки в одно функциональное семейство. Или такое объединение искусственное и вызвано недостатком наших знаний? Для этого необходимо привести те признаки, по которым эти белки были выделены в отдельный класс [1, 9].

1. Биологические антифризы понижают температуру замерзания неколлигативно, т. е. функция зависимости снижения температуры замерзания их растворов от их концентрации не прямая, а подобна гиперболе с плато в области высоких концентраций АФП, что свидетельствует об эффекте насыщения. При этом АФП понижают температуру замерзания растворов в несколько сотен раз эффективнее, чем другие макромолекулы сопоставимых размеров. Понижая температуру замерзания, антифризы практически не влияют на температуру плавления, вследствие чего равновесие между твердой и жидкой фазами антифризных систем отсутствует. Это выражено кривой температурного гистерезиса. Этот пункт приходится пересматривать, поскольку обнаружены белки с чрезвычайно низкими значениями термогистерезиса [34, 55]. Их защитная роль, как считают, заключается в антирекристаллизационной активности. Остается открытым вопрос о выделении этой группы белков в отдельное функциональное семейство.

present. This is shown by temperature hysteresis curve. This item has to be revised, since proteins with extremely low hysteresis values were found out [34, 55]. Their protective role is believed to consist in anti-recrystallisation activity. The question about distinguishing this group of proteins in a separate functional family is still open.

2. In contrast to usual colligative depressants, AFP molecules are not concentrated in a liquid phase during solution freezing, they are uniformly spread between solid and liquid phases, *i. e.* partially “freeze” together with water, AFP molecules do not introduce into ice structure, but adsorbed on ice seed crystal surface as a monolayer. This is testified by the plateau in dependency curve of AFGPs activity on a concentration. Generally, these notions did not undergo principal changes [1].

3. AFPs and AFGPs were previously believed to bind with prismatic planes of embryonic crystals. However, these notions should be revised, since some of AFPs are known as capable for binding with basal surfaces [59].

What is common between different AFPs besides a non-colligative character of their activity dependency on concentration? Location of AFPs molecules as a monolayer on a surface of embryonic crystals is provided by the complementarity between a spatial structure of AFPs and AFGPs (what different it could be) and ice lattice in embryonic crystals, which area in biological systems may vary within $2 \times 10^4 - 1 \times 10^6 \text{ \AA}^2$ limits [26]. Consequently, functional groups of AFPs active center, responsible for ice-binding, “mimic” crystal structure, therefore namely they, but not free water molecules, receive the possibility of a preferential crystal-binding, thereby blocking its following growth [45]. Apparently, this capability is universal characteristics, uniting various AFPs into a general functional family. However the data about AFPs, having two efficient concentrations: for homogenous nucleation, when binding with embryonic crystals occurs, and heterogeneous one, where AFPs are bound with dust particles, are in prospect to be included into this hypothesis [13]. The results, obtained by Du *et al.* exclude a fundamental contradiction on this question, since AFPs adsorption on a surface of alien particles disorders a structural conformity between this surface and nucleating ice, *i. e.* in this case it means a spatial complementarity between a structure of protein molecule and the surface, which this molecule interacts to.

Conclusions

Thus, a new information about amazing properties of these substances appears. Their classification is not perfect. Many questions about the

2. В отличие от обычных коллигативных депрессантов, молекулы АФП не концентрируются в жидкой фазе при замерзании растворов, они равномерно распределяются между твердой и жидкой фазами, т. е. частично “замерзают” вместе с водой, молекулы АФП не внедряются в структуру льда, а адсорбируются на поверхности зародышевых кристаллов льда в виде монослоя. Об этом свидетельствует плато в кривой зависимости активности АФГП от концентрации. В целом данные представления не претерпели кардинальных изменений [1].

3. Ранее полагали, что АФП и АФГП связываются с призматическими гранями зародышевых кристаллов. Однако эти представления необходимо пересмотреть, так как известно, что некоторые АФП способны связываться с базальными поверхностями [59].

Что же общего между различными АФП, кроме неколлигативного характера зависимости их активности от концентрации? Расположение молекул АФП в виде монослоя на поверхности зародышевых кристаллов обеспечивается комплементарностью между пространственной структурой АФП и АФГП (какой бы различной она ни была) и решеткой льда в зародышевых кристаллах, площадь которых в биологических системах может колебаться в пределах $2 \times 10^4 - 1 \times 10^6 \text{ \AA}^2$ [26]. Следовательно, функциональные группы активного центра АФП, отвечающие за связывание с кристаллом, “мимикрируют” структуру кристалла и поэтому именно они, а не свободные молекулы воды, получают возможность преимущественного связывания с кристаллом, тем самым блокируя его дальнейший рост [45]. По-видимому, эта способность является универсальной характеристикой, объединяющей разнообразные АФП в общее функциональное семейство. Однако в эту гипотезу предстоит включить данные об АФП, имеющих две эффективные концентрации: для нуклеации гомогенной, когда происходит связывание с зародышевыми кристаллами, и гетерогенной, когда АФП связываются с чужеродными частицами [13]. Результаты, полученные Du *et al.*, исключают принципиальные противоречия по данному вопросу, поскольку адсорбция АФП на поверхности чужеродных частиц нарушает структурное соответствие между этой поверхностью и зарождающимся льдом, т. е. и в этом случае речь идет о пространственной комплементарности между структурой белковой молекулы и поверхностью, с которой эта молекула взаимодействует.

Выводы

Таким образом, поступает новая информация об удивительных свойствах этих веществ. Их классификация далека от совершенства. Остаются также открытыми многие вопросы о механизмах их дейст-

mechanisms of their action have remained still open as well. In next report we will try to summarise the data about origin, regulation and stability of AFPs, as well as perspectives of their application in various fields.

References

1. Avonov A.L. Biological antifreezes and mechanism of their activity // *Molekularnaya biologiya*.— 1990.— Vol. 24, N3.— P. 581–597.
2. Achenbach J.C., Ewart K.V. Structural and functional characterization of a C-type lectin-like antifreeze protein from rainbow smelt (*Osmerus mordax*) // *Eur. J. Biochem.*— 2002.— Vol. 269, N4.— P. 1219–1226.
3. Ananthanarayanan V.S., Hew C.L. Structural studies on the freezing-point-depressing protein of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*— 1977.— Vol. 74, N2.— P. 685–689.
4. Baardsnes J., Jelokhani-Niaraki M., Kondejewski L.H. *et al.* Antifreeze protein from shorthorn sculpin: identification of the ice-binding surface // *Protein. Sci.*— 2001.— Vol. 10, N12.— P. 2566–2576.
5. Barrett J. Thermal hysteresis proteins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*— 2001.— Vol. 33, Issue 2.— P. 105–117.
6. Bennett V.A., Sformo T., Walters K. *et al.* Comparative overwintering physiology of Alaska and Indiana populations of the beetle *Cucujus clavipes* (*Fabricius*): roles of antifreeze proteins, polyols, dehydration and diapause // *J. Exp. Biol.*— 2005.— Vol. 208, Pt. 23.— P. 4467–4477.
7. Bouvet V.R., Lorello G.R., Ben R.N. Aggregation of antifreeze glycoprotein fraction 8 and its effect on antifreeze activity // *Biomacromolecules.*— 2006.— Vol. 7, N2.— P. 565–571.
8. Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J. *et al.* Structure and function of antifreeze proteins // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*— 2002.— Vol. 357, N1423.— P. 927–935.
9. Davies P.L., Hew C.L. Biochemistry of fish antifreeze proteins // *FASEB J.*— 1990.— Vol. 4.— P. 2460–2468.
10. DeLuca C.I., Davies P.L., Ye Q. *et al.* The effects of steric mutations on the structure of type III antifreeze protein and its interaction with ice // *J. Mol. Biol.*— 1998.— Vol. 275, N3.— P. 515–525.
11. DeVries A.L., Komatsu S.K., Feeney R.E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes // *J. Biol. Chem.*— 1970.— Vol. 245, N11.— P. 2901–2908.
12. DeVries A.L., Vandenheede J., Feeney R.E. Primary structure of freezing point-depressing glycoproteins // *J. Biol. Chem.*— 1971.— Vol. 246, N2.— P. 305–308.
13. Du N., Liu Y.X., Hew C.L. Ice nucleation inhibition: mechanism of antifreeze by antifreeze protein // *J. Biol. Chem.*— 2003.— Vol. 278, N38.— P. 36000–36004.
14. Duman J.G., Verleye D., Li N. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis* // *J. Comp. Physiol. [B]*.— 2002.— Vol. 172, N6.— P. 547–552.
15. Duncker B.P., Gauthier S.Y., Davies P.L. Evidence for a proprotein intermediate during maturation of type II antifreeze protein in sea raven, *Hemipterus americanus* // *Biochim. Biophys. Acta.*— 1996.— Vol. 1292, N2.— P. 312–316.
16. Duncker B.P., Hermans J.A., Davies P.L. *et al.* Expression of a cystine-rich fish antifreeze in transgenic *Drosophila melanogaster* // *Transgenic Res.*— 1996.— Vol. 5, N1.— P. 49–55.

вия. В следующем сообщении мы попытаемся обобщить данные о происхождении, регуляции и стабильности АФП, а также о перспективах их применения в различных областях.

Литература

1. Аванов А. Л. Биологические антифризы и механизм их активности // Молекулярная биология.– 1990.– Т. 24, №3.– С. 581–597.
2. Achenbach J.C., Ewart K.V. Structural and functional characterization of a C-type lectin-like antifreeze protein from rainbow smelt (*Osmerus mordax*) // Eur. J. Biochem.– 2002.– Vol. 269, N4.– P. 1219–1226.
3. Ananthanarayanan V.S., Hew C.L. Structural studies on the freezing-point-depressing protein of the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1977.– Vol. 74, N2.– P. 685–689.
4. Baardsnes J., Jelokhani-Niaraki M., Kondejewski L.H. et al. Antifreeze protein from shorthorn sculpin: identification of the ice-binding surface // Protein. Sci.– 2001.– Vol. 10, N12.– P. 2566–2576.
5. Barrett J. Thermal hysteresis proteins // Int. J. Biochem. Cell Biol.– 2001.– Vol. 33, Issue 2.– P. 105–117.
6. Bennett V.A., Sformo T., Walters K. et al. Comparative overwintering physiology of Alaska and Indiana populations of the beetle *Cucujus clavipes* (Fabricius): roles of antifreeze proteins, polyols, dehydration and diapause // J. Exp. Biol.– 2005.– Vol. 208, Pt. 23.– P. 4467–4477.
7. Bouvet V.R., Lorello G.R., Ben R.N. Aggregation of antifreeze glycoprotein fraction 8 and its effect on antifreeze activity // Biomacromolecules.– 2006.– Vol. 7, N2.– P. 565–571.
8. Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J. et al. Structure and function of antifreeze proteins // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.– 2002.– Vol. 357, N1423.– P. 927–935.
9. Davies P.L., Hew C.L. Biochemistry of fish antifreeze proteins // FASEB J.– 1990.– Vol. 4.– P. 2460–2468.
10. DeLuca C.I., Davies P.L., Ye Q. et al. The effects of steric mutations on the structure of type III antifreeze protein and its interaction with ice // J. Mol. Biol.– 1998.– Vol. 275, N3.– P. 515–525.
11. DeVries A.L., Komatsu S.K., Feeney R.E. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes // J. Biol. Chem.– 1970.– Vol. 245, N11.– P. 2901–2908.
12. DeVries A.L., Vandenheede J., Feeney R.E. Primary structure of freezing point-depressing glycoproteins // J. Biol. Chem.– 1971.– Vol. 246, N2.– P. 305–308.
13. Du N., Liu Y.X., Hew C.L. Ice nucleation inhibition: mechanism of antifreeze by antifreeze protein // J. Biol. Chem.– 2003.– Vol. 278, N38.– P. 36000–36004.
14. Duman J.G., Verleye D., Li N. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis* // J. Comp. Physiol. [B].– 2002.– Vol. 172, N6.– P. 547–552.
15. Duncker B.P., Gauthier S.Y., Davies P.L. Evidence for a proprotein intermediate during maturation of type II antifreeze protein in sea raven, *Hemirhamphus intermedius* // Biochim. Biophys. Acta.– 1996.– Vol. 1292, N2.– P. 312–316.
16. Duncker B.P., Hermans J.A., Davies P.L. et al. Expression of a cystine-rich fish antifreeze in transgenic *Drosophila melanogaster* // Transgenic Res.– 1996.– Vol. 5, N1.– P. 49–55.
17. Ewart K.V., Yang D.S., Ananthanarayanan V.S. et al. Ca²⁺-dependent antifreeze proteins. Modulation of conformation and activity by divalent metal ions // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N28.– P. 16627–16632.
18. Fairley K., Westman B.J., Pham L.H. et al. Type I shorthorn sculpin antifreeze protein: recombinant synthesis, solution
19. Fei Y.B., Cao P.X., Gao S.Q. et al. Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus* // Prep. Biochem. Biotechnol.– 2008.– Vol. 38, N2.– P. 172–183.
20. Feeney R.E. A biological antifreeze // Am. Sci.– 1974.– Vol. 62, N6.– P. 712–719.
21. Feeney R.E., Yeh Y. Antifreeze proteins from fish bloods // Adv. Protein Chem.– 1978.– Vol. 32.– P. 191–282.
22. Garnham C.P., Gilbert J.A., Hartman C.P. et al. A Ca²⁺-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold // Biochem. J.– 2008.– Vol. 411, N1.– P. 171–180.
23. Gilbert J.A., Davies P.L., Laybourn-Parry J. A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium // JFEMS Microbiol. Lett.– 2005.– Vol. 245, N1.– P. 67–72.
24. Graether S.P., DeLuca C.I., Baardsnes J. et al. Quantitative and qualitative analysis of type III antifreeze protein structure and function // J. Biol. Chem.– 1999.– Vol. 274, N17.– P. 11842–11847.
25. Graether S.P., Gagne S.M., Spyropoulos L. et al. Spruce budworm antifreeze protein: changes in structure and dynamics at low temperature // J. Mol. Biol.– 2003.– Vol. 327, N5.– P. 1155–1168.
26. Graether S.P., Jia Z. Modeling *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein as a beta-helical protein // Biophys. J.– 2001.– Vol. 80, N3.– P. 1169–1173.
27. Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M. et al. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect // Nature.– 2000.– Vol. 406, N6793.– P. 249–251.
28. Graham L.A., Davies P.L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas // Science.– 2005.– Vol. 310, N5747.– P. 461.
29. Graham L.A., Marshall C.B., Lin F.H. et al. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites // Biochemistry.– 2008.– Vol. 47, N7.– P. 2051–2063.
30. Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities // Trends. Plant. Sci.– 2004.– Vol. 9, N8.– P. 399–405.
31. Harding M.M., Ward L.G., Haymet A.D. Type I 'antifreeze' proteins. Structure-activity studies and mechanisms of ice growth inhibition // Eur. J. Biochem.– 1999.– Vol. 264, N3.– P. 653–665.
32. Hew C.L., Fletcher G.L., Ananthanarayanan V.S. Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization // Can. J. Biochem.– 1980.– Vol. 58, N5.– P. 377–383.
33. Holland N.B., Nishimiya Y., Tsuda S. et al. Activity of a two-domain antifreeze protein is not dependent on linker sequence // Biophys. J.– 2007.– Vol. 92, N2.– P. 541–546.
34. Huang T., Duman J.G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* // Plant. Mol. Biol.– 2002.– Vol. 48, N4.– P. 339–350.
35. Jia Z., Davies P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction // Trends Biochem. Sci.– 2002.– Vol. 27, N2.– P. 101–106.
36. Jia Z., DeLuca C.I., Chao H. et al. Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice // Nature.– 1996.– Vol. 384, N6606.– P. 285–288.

- conformation, and ice growth inhibition studies // J. Biol. Chem.– 2002.– Vol. 277, N27.– P. 24073–24080.
19. Fei Y.B., Cao P.X., Gao S.Q. et al. Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus* // Prep. Biochem. Biotechnol.– 2008.– Vol. 38, N2.– P. 172–183.
 20. Feeney R.E. A biological antifreeze // Am. Sci.– 1974.– Vol. 62, N6.– P. 712–719.
 21. Feeney R.E., Yeh Y. Antifreeze proteins from fish bloods // Adv. Protein Chem.– 1978.– Vol. 32.– P. 191–282.
 22. Garnham C.P., Gilbert J.A., Hartman C.P. et al. A Ca²⁺-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold // Biochem. J.– 2008.– Vol. 411, N1.– P. 171–180.
 23. Gilbert J.A., Davies P.L., Laybourn-Parry J. A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium // JFEMS Microbiol. Lett.– 2005.– Vol. 245, N1.– P. 67–72.
 24. Graether S.P., DeLuca C.I., Baardsnes J. et al. Quantitative and qualitative analysis of type III antifreeze protein structure and function // J. Biol. Chem.– 1999.– Vol. 274, N17.– P. 11842–11847.
 25. Graether S.P., Gagne S.M., Spyropoulos L. et al. Spruce budworm antifreeze protein: changes in structure and dynamics at low temperature // J. Mol. Biol.– 2003.– Vol. 327, N5.– P. 1155–1168.
 26. Graether S.P., Jia Z. Modeling *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein as a beta-helical protein // Biophys. J.– 2001.– Vol. 80, N3.– P. 1169–1173.
 27. Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M. et al. Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect // Nature.– 2000.– Vol. 406, N6793.– P. 249–251.
 28. Graham L.A., Davies P.L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas // Science.– 2005.– Vol. 310, N5747.– P. 461.
 29. Graham L.A., Marshall C.B., Lin F.H. et al. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites // Biochemistry.– 2008.– Vol. 47, N7.– P. 2051–2063.
 30. Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities // Trends. Plant. Sci.– 2004.– Vol. 9, N8.– P. 399–405.
 31. Harding M.M., Ward L.G., Haymet A.D. Type I 'antifreeze' proteins. Structure–activity studies and mechanisms of ice growth inhibition // Eur. J. Biochem.– 1999.– Vol. 264, N3.– P. 653–665.
 32. Hew C.L., Fletcher G.L., Ananthanarayanan V.S. Antifreeze proteins from the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius*: isolation and characterization // Can. J. Biochem.– 1980.– Vol. 58, N5.– P. 377–383.
 33. Holland N.B., Nishimiya Y., Tsuda S. et al. Activity of a two-domain antifreeze protein is not dependent on linker sequence // Biophys. J.– 2007.– Vol. 92, N2.– P. 541–546.
 34. Huang T., Duman J.G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* // Plant. Mol. Biol.– 2002.– Vol. 48, N4.– P. 339–350.
 35. Jia Z., Davies P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction // Trends Biochem. Sci.– 2002.– Vol. 27, N2.– P. 101–106.
 36. Jia Z., DeLuca C.I., Chao H. et al. Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice // Nature.– 1996.– Vol. 384, N6606.– P. 285–288.
 37. Juge N. Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes // Trends Plant Sci.– 2006.– Vol. 11, N7.– P. 359–367.
 38. Kawahara H., Iwanaka Y., Higa S. et al. A novel, intracellular antifreeze protein in an antarctic bacterium, *Flavobacterium xanthum* // Cryo Letters.– 2007.– Vol. 28, N1.– P. 39–49.
 39. Ko T.P., Robinson H., Gao Y.G. et al. The refined crystal structure of an eel pout type III antifreeze protein RD1 at 0.62 – a resolution reveals structural microheterogeneity of protein and solvation // Biophys. J.– 2003.– Vol. 84, N2, Pt. 1.– P. 1228–1237.
 40. Komatsu S., DeVries A.L., Feeney R.E. Studies of the structure of freezing point–depressing glycoproteins from an Antarctic fish // J. Biol. Chem.– 1970.– Vol. 245, N11.– P. 2909–2913.
 41. Kuiper M.J., Davies P.L., Walker V.K. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne* // Biophys. J.– 2001.– Vol. 81, N6.– P. 3560–3565.
 42. Lin F.H., Graham L.A., Campbell R.L. et al. Structural modeling of snow flea antifreeze protein // Biophys. J.– 2007.– Vol. 92, N5.– P. 1717–1723.
 43. Lin Y., Duman J.G., DeVries A.L. Studies on the structure and activity of low molecular weight glycoproteins from an antarctic fish // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 1972.– Vol. 46, N1.– P. 87–92.
 44. Liou Y.C., Daley M.E., Graham L.A. et al. Folding and structural characterization of highly disulfide–bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria // Protein Expr. Purif.– 2000.– Vol. 19, N1.– P. 148–157.
 45. Liou Y.C., Tocilj A., Davies P.L. et al. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta–helix antifreeze protein // Nature.– 2000.– Vol. 406, N6793.– P. 322–324.
 46. Liu Y., Li Z., Lin Q. et al. Structure and evolutionary origin of Ca²⁺-dependent herring type II antifreeze protein // PLoS ONE.– 2007.– Vol. 2, N6.– P. e548.
 47. Loewen M.C., Gronwald W., Sönnichsen F.D. et al. The ice-binding site of sea raven antifreeze protein is distinct from the carbohydrate-binding site of the homologous C-type lectin // Biochemistry.– 1998.– Vol. 37, N51.– P. 17745–17753.
 48. Marshall C.B., Chakrabarty A., Davies P.L. Hyperactive antifreeze protein from winter flounder is a very long rod-like dimer of alpha-helices // J. Biol. Chem.– 2005.– Vol. 280, N18.– P. 17920–17929.
 49. Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A. et al. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* // FEBS Lett.– 2002.– Vol. 529, N2–3.– P. 261–267.
 50. Miura K., Ohgiya S., Hoshino T. et al. Determination of the solution structure of the N–domain plus linker of Antarctic eel pout antifreeze protein RD3 // J. Biochem.– 1999.– Vol. 126, N2.– P. 387–394.
 51. Muryoi N., Sato M., Kaneko S. et al. Cloning and expression of afpA, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth–promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12–2 // J. Bacteriol.– 2004.– Vol. 186, N17.– P. 5661–5671.
 52. Newsted W.J., Polvi S., Papish B. A low molecular weight peptide from snow mold with epitopic homology to the winter flounder antifreeze protein // Biochem. Cell Biol.– 1994.– Vol. 72, N3–4.– P. 152–156.
 53. Nishimiya Y., Ohgiya S., Tsuda S. Artificial multimers of the type III antifreeze protein. Effects on thermal hysteresis and ice crystal morphology // J. Biol. Chem.– 2003.– Vol. 278, N34.– P. 32307–32312.
 54. Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation // Gene.– 2006.– Vol. 367.– P. 142–149.
 55. Pudney P.D., Buckley S.L., Sidebottom C.M. et al. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) // Arch. Biochem. Biophys.– 2003.– Vol. 410, N2.– P. 238–245.

- 0.62 – a resolution reveals structural microheterogeneity of protein and solvation // *Biophys. J.*– 2003.– Vol. 84, N2, Pt. 1.– P. 1228–1237.
40. Komatsu S., DeVries A.L., Feeney R.E. Studies of the structure of freezing point–depressing glycoproteins from an Antarctic fish // *J. Biol. Chem.*– 1970.– Vol. 245, N11.– P. 2909–2913.
 41. Kuiper M.J., Davies P.L., Walker V.K. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne* // *Biophys. J.*– 2001.– Vol. 81, N6.– P. 3560–3565.
 42. Lin F.H., Graham L.A., Campbell R.L. et al. Structural modeling of snow flea antifreeze protein // *Biophys. J.*– 2007.– Vol. 92, N5.– P. 1717–1723.
 43. Lin Y., Duman J.G., DeVries A.L. Studies on the structure and activity of low molecular weight glycoproteins from an antarctic fish // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 1972.– Vol. 46, N1.– P. 87–92.
 44. Liou Y.C., Daley M.E., Graham L.A. et al. Folding and structural characterization of highly disulfide–bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria // *Protein Expr. Purif.*– 2000.– Vol. 19, N1.– P. 148–157.
 45. Liou Y.C., Tocilj A., Davies P.L. et al. Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta–helix antifreeze protein // *Nature.*– 2000.– Vol. 406, N6793.– P. 322–324.
 46. Liu Y., Li Z., Lin Q. et al. Structure and evolutionary origin of Ca²⁺–dependent herring type II antifreeze protein // *PLoS ONE.*– 2007.– Vol. 2, N6.– P. e548.
 47. Loewen M.C., Gronwald W., Sönnichsen F.D. et al. The ice-binding site of sea raven antifreeze protein is distinct from the carbohydrate-binding site of the homologous C-type lectin // *Biochemistry.*– 1998.– Vol. 37, N51.– P. 17745–17753.
 48. Marshall C.B., Chakrabarty A., Davies P.L. Hyperactive antifreeze protein from winter flounder is a very long rod-like dimer of alpha-helices // *J. Biol. Chem.*– 2005.– Vol. 280, N18.– P. 17920–17929.
 49. Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A. et al. Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* // *FEBS Lett.*– 2002.– Vol. 529, N2–3.– P. 261–267.
 50. Miura K., Ohgiya S., Hoshino T. et al. Determination of the solution structure of the N–domain plus linker of Antarctic eel pout antifreeze protein RD3 // *J. Biochem.*– 1999.– Vol. 126, N2.– P. 387–394.
 51. Murayoi N., Sato M., Kaneko S. et al. Cloning and expression of afpA, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth–promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12–2 // *J. Bacteriol.*– 2004.– Vol. 186, N17.– P. 5661–5671.
 52. Newsted W.J., Polvi S., Papish B. A low molecular weight peptide from snow mold with epitopic homology to the winter flounder antifreeze protein // *Biochem. Cell Biol.*– 1994.– Vol. 72, N3–4.– P. 152–156.
 53. Nishimiya Y., Ohgiya S., Tsuda S. Artificial multimers of the type III antifreeze protein. Effects on thermal hysteresis and ice crystal morphology // *J. Biol. Chem.*– 2003.– Vol. 278, N34.– P. 32307–32312.
 54. Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation // *Gene.*– 2006.– Vol. 367.– P. 142–149.
 55. Pudney P.D., Buckley S.L., Sidebottom C.M. et al. The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) // *Arch. Biochem. Biophys.*– 2003.– Vol. 410, N2.– P. 238–245.
 56. Raymond J.A., Fritsen C., Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium // *FEMS Microbiol. Ecol.*– 2007.– Vol. 61, N2.– P. 214–221.
 57. Raymond J.A., Lin Y., DeVries A.L. Glycoprotein and protein antifreezes in two Alaskan fishes // *J. Exp. Zool.*– 1975.– Vol. 193, N1.– P. 125–130.
 58. Raymond J.A., Knight C.A. Ice binding, recrystallization inhibition, and cryoprotective properties of ice–active substances associated with Antarctic sea ice diatoms // *Cryobiology.*– 2003.– Vol. 46, N2.– P. 174–181.
 59. Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. et al. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins // *Cryobiology.*– 2006.– Vol. 53, N2.– P. 229–239.
 60. Shier W.T., Lin Y., DeVries A.L. Structure and mode of action of glycoproteins from an antarctic fish // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1972.– Vol. 263, N2.– P. 406–413.
 61. Shier W.T., Lin Y., DeVries A.L. Structure of the carbohydrate of antifreeze glycoproteins from an antarctic fish // *FEBS Lett.* 1975.– Vol. 54, N2.– P. 135–138.
 62. Smallwood M., Worrall D., Byass L. et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) // *Biochem. J.*– 1999.– Vol. 340, Pt. 2.– P. 385–391.
 63. Sönnichsen F.D., Sykes B.D., Davies P.L. Comparative modeling of the three-dimensional structure of type II antifreeze protein // *Protein Sci.*– 1995.– Vol. 4, N3.– P. 460–471.
 64. Tremblay K., Ouellet F., Fournier J. et al. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals // *Plant Cell Physiol.*– 2005.– Vol. 46, N6.– P. 884–891.
 65. Vandenheede J.R., Ahmed A.I., Feeney R.E. Structure and role of carbohydrate in freezing point–depressing glycoproteins from an antarctic fish // *J. Biol. Chem.*– 1972.– Vol. 247, N24.– P. 7885–7889.
 66. Wang X., DeVries A.L., Cheng C.H. Antifreeze peptide heterogeneity in an antarctic eel pout includes an unusually large major variant comprised of two 7 kDa type III AFPs linked in tandem // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1995.– Vol. 1247, N2.– P. 163–172.
 67. Wang X., DeVries A.L., Cheng C.H. Genomic basis for antifreeze peptide heterogeneity and abundance in an Antarctic eel pout: gene structures and organization // *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*– 1995.– Vol. 4, N2.– P. 135–147.
 68. Wang L., Duman J.G. Antifreeze proteins of the beetle *Dendroides canadensis* enhance one another's activities // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, N 30. – P. 10305–10312.
 69. Wharton D.A., Barrett J., Goodall G. et al. Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* // *Cryobiology.*– 2005.– Vol. 51, N2.– P. 198–207.
 70. Wharton D.A., Block W. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) which survives intracellular freezing // *Cryobiology.*– 1997.– Vol. 34, N2.– P. 114–121.
 71. Wierzbicki A., Madura J.D., Salmon C. et al. Modeling studies of binding of sea raven type II antifreeze protein to ice // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*– 1997.– Vol. 37, N6.– P. 1006–1010.
 72. Yaish M.W., Doxey A.C., McConkey B.J. et al. Cold–active winter rye glucanases with ice-binding capacity // *Plant Physiol.*– 2006.– Vol. 141, N4.– P. 1459–1472.
 73. Yamashita Y., Miura R., Takemoto Y. et al. Type II antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003.– Vol. 67, N3.– P. 461–466.
 74. Yu X.M., Griffith M. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes // *Plant Physiol.*– 1999.– Vol. 119, N4.– P. 1361–1370.

57. Raymond J.A., Lin Y., DeVries A.L. Glycoprotein and protein antifreezes in two Alaskan fishes // J. Exp. Zool.– 1975.– Vol. 193, N1.– P. 125–130.
58. Raymond J.A., Knight C.A. Ice binding, recrystallization inhibition, and cryoprotective properties of ice-active substances associated with Antarctic sea ice diatoms // Cryobiology.– 2003.– Vol. 46, N2.– P. 174–181.
59. Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. et al. The basis for hyperactivity of antifreeze proteins // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N2.– P. 229–239.
60. Shier W.T., Lin Y., DeVries A.L. Structure and mode of action of glycoproteins from an antarctic fish // Biochim. Biophys. Acta.– 1972.– Vol. 263, N2.– P. 406–413.
61. Shier W.T., Lin Y., DeVries A.L. Structure of the carbohydrate of antifreeze glycoproteins from an antarctic fish // FEBS Lett. 1975.– Vol. 54, N2. – P. 135–138.
62. Smallwood M., Worrall D., Byass L. et al. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) // Biochem. J.– 1999.– Vol. 340, Pt. 2.– P. 385–391.
63. Sönnichsen F.D., Sykes B.D., Davies P.L. Comparative modeling of the three-dimensional structure of type II antifreeze protein // Protein Sci.– 1995.– Vol. 4, N3.– P. 460–471.
64. Tremblay K., Ouellet F., Fournier J. et al. Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals // Plant Cell Physiol.– 2005.– Vol. 46, N6.– P. 884–891.
65. Vandenheede J.R., Ahmed A.I., Feeney R.E. Structure and role of carbohydrate in freezing point-depressing glycoproteins from an antarctic fish // J. Biol. Chem.– 1972.– Vol. 247, N24.– P. 7885–7889.
66. Wang X., DeVries A.L., Cheng C.H. Antifreeze peptide heterogeneity in an antarctic eel pout includes an unusually large major variant comprised of two 7 kDa type III AFPs linked in tandem // Biochim. Biophys. Acta.– 1995.– Vol. 1247, N2.– P. 163–172.
67. Wang X., DeVries A.L., Cheng C.H. Genomic basis for antifreeze peptide heterogeneity and abundance in an Antarctic eel pout: gene structures and organization // Mol. Mar. Biol. Biotechnol.– 1995.– Vol. 4, N2.– P. 135–147.
68. Wang L., Duman J.G. Antifreeze proteins of the beetle *Dendroides canadensis* enhance one another's activities // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44, N 30. – P. 10305–10312.
69. Wharton D.A., Barrett J., Goodall G. et al. Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* // Cryobiology.– 2005.– Vol. 51, N2.– P. 198–207.
70. Wharton D.A., Block W. Differential scanning calorimetry studies on an Antarctic nematode (*Panagrolaimus davidi*) which survives intracellular freezing // Cryobiology.– 1997.– Vol. 34, N2.– P. 114–121.
71. Wierzbicki A., Madura J.D., Salmon C. et al. Modeling studies of binding of sea raven type II antifreeze protein to ice // J. Chem. Inf. Comput. Sci.– 1997.– Vol. 37, N6.– P. 1006–1010.
72. Yaish M.W., Doxey A.C., McConkey B.J. et al. Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity // Plant Physiol.– 2006.– Vol. 141, N4.– P. 1459–1472.
73. Yamashita Y., Miura R., Takemoto Y. et al. Type II antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*) // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2003.– Vol. 67, N3.– P. 461–466.
74. Yu X.M., Griffith M. Antifreeze proteins in winter rye leaves form oligomeric complexes // Plant Physiol.– 1999.– Vol. 119, N4.– P. 1361–1370.
75. Zhang D.Q., Wang H.B., Liu B. et al. Carrot antifreeze protein does not exhibit the polygalacturonase-inhibiting activity of PGIP family // Yi Chuan Xue Bao.– 2006.– Vol. 33, N11.– P. 1027–1036.
76. Zettlemoyer A.C. Hydrophobic surfaces // J. Coll. Inter. Sci.– 1968.– Vol. 28, N6.– P. 343–369.

Accepted in 12.08.2008

Поступила 12.08.2008
Рецензент Н.Г. Землянских