

Нуклеирующие агенты позвоночных и беспозвоночных животных**Nucleating Agents of Vertebrates and Invertebrates**

В обзоре представлены сведения о структуре и активности нуклеирующих агентов беспозвоночных и позвоночных. Дано сравнительное описание нуклеаторов животных и нуклеаторов бактериального происхождения.

Ключевые слова: белки-нуклеаторы, устойчивость к заморзанию, насекомые, тихоходки, амфибии, рептилии.

В обзори подано відомості щодо структури та активності нуклеуючих агентів безхребетних та хребетних. Подано порівняльний опис нуклеаторів тварин та нуклеаторів бактеріального походження.

Ключові слова: білки-нуклеатори, стійкість до замерзання, комахи, тихохідки, амфібії, рептилії.

The information on invertebrate and vertebrate nucleating agent structure and activity is presented in the review. The data on animals' nucleators are compared with those of nucleators of bacterial origin.

Key words: ice nucleating proteins, freeze-tolerance, insects, tardigrades, amphibia, reptiles.

Заморзання рідкої речовини починається з утворення ядра – нуклеуса (от лат. *nucleus*), який має льодоподібну структуру. Етап ініціації заморзання рідкої речовини називається нуклеацією – фізичний процес, що відрізняється від каталізу і являється дуже незвичайною функцією для білків [43]. Здатність ініціювати формування кристалів льоду в переохолодженій воді притаманна ряду психро- і мезофільних бактерій [13]. Встановлено, що нуклеуючі агенти бактеріального походження є ліпоглікопротеїдними комплексами, які прийнято називати білками-нуклеаторами (БН) [32]. Внаслідок БН були виявлені у стійких до заморзання комах [10, 11, 23, 40, 42, 43], тихоходок [36] і моллюсків [1, 2, 14]. Існують також дані про наявність нуклеаторів білкової природи в плазмі стійких до заморзання позвончатих – дерев'яних лягушок *Rana sylvatica* [28] і черепах [29].

При цьому організми багатьох уникати замерзання тварин містять білки з нуклеюючою активністю, які в зимній період тваринам доводиться або маскувати, або від них уникати [9, 22].

Не всі стійкі до заморзання тварини здатні продукувати БН. Антарктична нематода *Panagrolaimus davidi* може вижити при внутрішньоклітинному кристаллоутворенні і перетворенні в лід майже 82% вмісту води в тілі і залежить від інкулятивного ("прививочного" або "заражаючого") заморзання, при

Freezing of liquid begins with formation of nucleus with ice-like structure. Initiation stage of liquid freezing is called nucleation, a physical process, differing from catalysis and being extremely unusual function for proteins [43]. The capacity of initiating ice crystallization in supercooled water is inherent to some psychro- and mesophilic bacteria [13]. It has been established that nucleating agents of bacterial origin are lipoglycoprotein complexes, commonly called as ice-nucleating proteins (INPs) [32]. Thereafter INPs were observed in freeze-tolerant insects [10, 11, 23, 40, 42, 43], tardigrades [36] and molluscs [1, 2, 14]. There are also the data about the presence of protein origin nucleators in plasma of freeze-tolerant invertebrates the wooden frog *Rana sylvatica* [28] and turtles [29].

Herewith in many freeze-avoiding animals there are proteins with nucleating activity, which animals either have to mask or eliminate in winter [9, 22].

Not all freeze-tolerant animals can produce INPs. The Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* can survive intercellular crystallization and transformation of nearly 82% of body water into ice and depends on inoculative ('contaminating') freezing wherein crystallization is initiated with environmental ice [37].

INPs of invertebrates

The nucleators were found in haemolymph of *hymenoptera*, *coleoptera* and *diptera* [40]. In many freeze-tolerant insects nucleators are present only in winter, for example in the tenebrionid beetle *Eleodes blanchardi* [42]. In summer haemolymph nucleators

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: (+380 57) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
lianaisaakovna@rambler.ru

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: lianaisaakovna@rambler.ru

котором кристаллизация инициируется льдом окружающей среды [37].

БН беспозвоночных

Нуклеаторы обнаружены в гемолимфе у жестко-, перепончато- и двукрылых [40]. У большинства устойчивых к замерзанию насекомых нуклеаторы присутствуют только зимой, например у чернотелки *Eleodes blanchardi* [42]. Летом нуклеаторы в гемолимфе отсутствуют, следовательно, переохлаждение жидкостей в теле насекомых более глубокое, поэтому они чувствительны к замерзанию. При наличии высокоактивных нуклеаторов гемолимфы менее эффективные кишечные и внутриклеточные нуклеаторы могут не инактивироваться и не удаляться в зимний период, при этом насекомые выдерживают неоднократные циклы замораживания-оттаивания [41]. В условиях обитания с флуктуациями субнулевых температур в течение суток летом, когда насекомые должны питаться, развиваться и размножаться, риск "ночного" замерзания под действием кишечных нуклеаторов предотвращается более эффективными нуклеаторами гемолимфы на протяжении всего года, например у *Phyllodecta laticollis* [34], *Seneciobius kenyanus* и *Pyrasystotes elongatus* [27].

При температурах выше 80°C нуклеаторы гемолимфы *E. blanchardi* [42] и *Vespula maculata* инактивируются [11]. Поскольку обработка протеазами приводила к инактивации нуклеатора *V. maculata*, авторы [10] пришли к выводу о его белковой природе. Молекулярная масса этого белка 74 кДа, он содержит 20% остатков глутамата, который, вероятно, позволяет ему упорядочивать молекулы воды в кристаллоподобные структуры.

Выделенный из гемолимфы личинок комара долгоножки *Tipula trivittata* БН имеет молекулярную массу 800 кДа [23]. Он состоит из двух белковых компонентов с молекулярной массой 80 и 265 кДа, а также липидного компонента, содержащего фосфатидилинозитол. У *T. trivittata* БН имеет повторяющуюся последовательность из 16 аминокислотных остатков, замещение которых другими аминокислотами приводило к потере нуклеирующей активности. Поскольку наличие повторов также является отличительной чертой первичных последовательностей БН бактерий, можно предположить, что повторяющиеся мотивы – необходимое условие проявления нуклеирующей активности. Возможно, именно наличие повторов обуславливает сворачивание молекул БН в конформацию, обеспечивающую взаимодействие с молекулами воды. Фосфатидилинозитол состав-

are absent, therefore liquid supercooling in insects' body is deeper, therefore they are sensitive to freezing. In the presence of highly active nucleators of haemolymph less effective intestinal and intracellular nucleators may be not inactivated and are not removed in winter time, herewith insects survive multiple cycles of freeze-thawing [41]. Under environmental conditions with fluctuations of subzero temperatures during a day in summer, when insects must feed, grow and reproduce, the risk of "night" freezing due to action of intestinal nucleators is prevented by more effective nucleators of haemolymph over the year, e. g. in *Phyllodecta laticollis* [34], *Seneciobius kenyanus* and *Pyrasystotes elongatus* [27].

Haemolymph nucleators of *E. blanchardi* [42] and *Vespula maculata* are inactivated under the temperatures above 80°C [11]. Whereas the treatment with proteases resulted in inactivation of *V. maculata* nucleator, the authors [10] concluded about its protein nature. The molecular mass of this protein makes 74 kDa and it comprises 20% of glutamate residues, which probably enables the ordering of water molecules into crystal-like structures.

The molecular mass of an INP derived from haemolymph of the meadow maggot *Tipula trivittata* is 800 kDa [23]. It consists of two protein components with 80 and 265 kDa molecular mass, and also lipid component, containing phosphatidyl inositol. In *T. trivittata* INP has a repeating sequence from 16 amino-acid residues, the replacement of which by others amino-acids resulted into a loss of nucleating activity. Since the presence of repeats is also a distinctive feature of primary sequences of bacterial INPs it may be suggested that repeating motifs are the essential condition for nucleating activity manifestation. Probably just the presence of the repeats stipulates the folding of INP molecules in conformation, providing interaction with water molecules. Phosphatidyl inositol makes nearly 11% of total content of phospholipids. The analysis carried-out with different phospholipases showed that phosphatidyl inositol was necessary for manifestation of nucleating activity. According to Warner D.T. the capacity of inositol to make the ordering of water into ice-like structures was noted [35], however according to Duman J.G. *et al.* it is necessary for the formation of huge INPs aggregates [12]. The importance of phosphatidyl inositol for manifestation of nucleating activity in bacteria, where it performs the "anchor" function in attaching the INPs to cell membrane was established [15]. Neither apolipoprotein, nor lipid component by themselves have a nucleating activity [23]. The results of experiments, carried-out in the designed proteoliposomes of different composition confirm that for manifestation of *T. trivittata* INP

ляет примерно 11% от общего содержания фосфолипидов. Анализ, проведенный с помощью различных фосфолипаз, показал, что фосфатидилинозитол необходим для проявления нуклеирующей активности. Warner D.T. отмечал способность инозитола упорядочивать воду в льдоподобные структуры [35]. Однако по мнению Duman J.G. *et al.* фосфатидилинозитол необходим для образования крупных агрегатов БН [12]. Важность фосфатидилинозитола для проявления нуклеирующей активности бактерий, у которых он выполняет функцию "якоря" в прикреплении БН к клеточной мембране, доказана [15]. Сами по себе ни аполипотеин, ни липидный компонент не обладают нуклеирующей активностью [23]. Результаты экспериментов, проведенных на сконструированных протеолипосомах различного состава, подтверждают, что для проявления нуклеирующей активности БН *T. trivitata* необходимо наличие белковой и липидной частей.

Липопротеин-нуклеатор *T. trivitata* является основным липопротеином гемолимфы и составляет более 95% от общего содержания липопротеинов [23]. В целом его состав сходен с составом других липопротеидов насекомых [5, 25]. Он также имеет глобулярную структуру, как и охарактеризованные ранее липопротеины [5, 6, 20, 24]. Известно, что такие липопротеиды выполняют функцию липофоринов. Возможно, что БН *T. trivitata*, помимо функции инициации кристаллизации, участвует в транспорте липидов [23]. Несмотря на отличия в составе БН *T. trivitata* и липофоринов (отсутствие фосфатидилинозитола и более высокая удельная доля белкового компонента в составе липофоринов [5, 25]), липофорины возможно были "предками" БН насекомых, поскольку транспортная функция скорее всего предшествовала нуклеаторной и была присуща липофоринам древних насекомых, обитавших в тропиках. Липопротеиды из гемолимфы личинок табачного бражника *Manduca sexta* и имаго таракана *Periplaneta* нуклеирующей активностью не обладают [23]. Однако липопротеиды с нуклеирующей активностью обнаружены у чувствительных к заморзанию видов насекомых [38]. Поскольку у таких насекомых естественный отбор должен был происходить в направлении элиминации активных нуклеаторов льда, возникает вопрос: почему неактивный в отношении нуклеации липофорин не является общераспространенной и основной формой? Вероятно, инактивированные формы липопротеида, которые можно получить у насекомых с помощью ювенильного гормона, лишены каких-либо компонентов, важных для транспортной функции липопротеидов, следовательно, эволю-

nucleating activity both protein and lipid parts are necessary.

T. trivitata lipoprotein nucleator is the main lipoprotein of haemolymph and makes above 95% of lipoproteins' total content [23]. On the whole its composition is similar to other lipoproteins of insects [5, 25]. It also has a globular structure as described above lipoproteins [5, 6, 20, 24]. It has been known that these lipoproteins perform function of lipophorines. Maybe *T. trivitata* INP in addition to crystallization initiation function takes part in lipid transport [23]. In spite of the differences in composition of *T. trivitata* INP and lipophorines (the absence of phosphatidyl inositol and higher specific part of protein component in composition of lipophorines [5, 25]), the latter were likely 'progenitors' of insects' INPs, whereas transport function most likely preceded nucleating one and was characteristic for lipophorines of ancient insects inhabiting in the tropics. Lipoproteins from haemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* and the cockroach imago *Periplaneta* express no nucleating activity [23]. However lipoproteins with nucleating activity were observed in freeze sensitive insect species [38]. Whereas in these insects the natural selection must take place towards elimination of active ice-nucleators, the question arises: why non-active in respect of nucleation lipophorine is not a common and basic form? Probably inactivated forms of lipoproteins, which may be derived from insects with juvenile hormones, were deficient of some components important for a transport function of lipoproteins and therefore the evolution impact could not fully eliminate nucleating activity. Seasonal and maybe hormonally regulated 'elimination' of nucleating activity of these lipoproteids during hypometabolic state takes place [26].

In contrary to bacterial INPs, INPs of insects were not attached to membranes. However they are also capable of aggregation, forming long chains, free-floating in haemolymph as well as single INPs [39]. Quite a high temperature of nucleation (-4°C), demonstrated by insects INPs was stipulated by the formation of aggregates with molecular mass up to 6,000 kDa [43]. For the formation of chains from INP-monomers phosphatidyl inositol is seemingly necessary [12]. The presence of plateau in the curve of nucleating activity dependence on concentration of insects' INPs points to the fact that these aggregates achieve the fixed size and do not grow any more as their concentration increases (Figure).

Some insects nucleators are of non-protein, but mineral nature. For example, freeze-tolerant larvae of the gall fly *Eurosta solidaginis* have spherules of calcium phosphate in Malpighian tubules, which

ционное давление не могло элиминировать нуклеирующую активность полностью. Происходит только сезонное, возможно регулируемое гормонально, "выключение" нуклеирующей активности таких липопротеидов во время гипометаболического состояния [26].

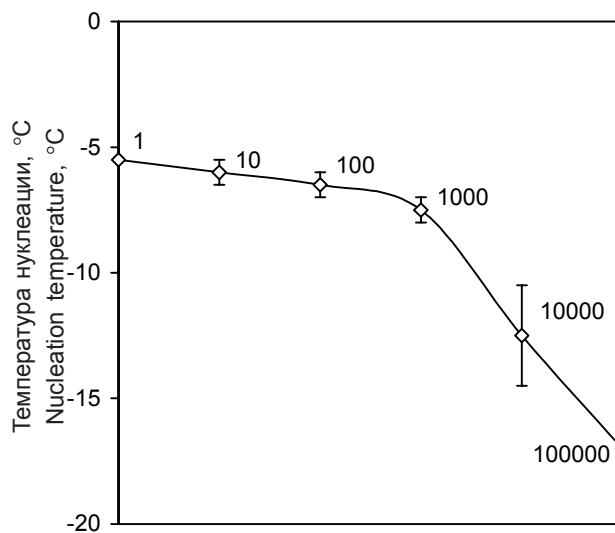
В отличие от БН бактерий, БН насекомых не прикреплены к мембранам. Однако они также способны к агрегации, образуя длинные цепочки, свободно плавающие в гемолимфе, как и одиночные БН [39]. Достаточно высокая температура нуклеации (-4°C), которую демонстрируют БН насекомых, обусловлена формированием агрегатов с молекулярной массой до 6000 кДа [43]. Для формирования цепочек из БН-мономеров, по видимому, необходим фосфатидилинозитол [12]. Наличие плато на кривой зависимости нуклеирующей активности от концентрации БН насекомых указывает на то, что эти агрегаты достигают определенного размера и при повышении концентрации далее не растут (рисунок).

Некоторые насекомые обладают нуклеаторами не белковой, а минеральной природы. Например, устойчивые к замерзанию личинки галловой мухи *Eurosta solidaginis* имеют в мальпигиевых трубочках сферулы из фосфата кальция, которые способны инициировать кристаллизацию почти при -10°C , что совпадает с температурой замерзания личинок ($-9,5^{\circ}\text{C}$) и весьма сильно отличается от температуры замерзания гемолимфы (-18°C) [21].

Высокая температура кристаллизации интактных тихоходок *Adorybiotus coronifera* подтверждает присутствие в жидкостях тела нуклеирующих агентов, которые инактивируются при температуре выше 68°C , что свидетельствует об их белковой природе. Гель-фильтрация гомогенатов, полученных из *A. coronifera*, указывает на то, что молекулярная масса нуклеирующих агентов тихоходок должна быть выше 200 кДа [36].

Костянка обыкновенная *Lithobius forficatus* устойчива к замерзанию в зимний период. Tursman D. *et al.* [33] предположили присутствие нуклеаторов в организме *L. forficatus* зимой, однако их природа не описана. Не исключено, что устойчивость к замерзанию у *L. forficatus* все же зависит от инокулятивного замерзания. Если же в организме этой многоножки и присутствуют нуклеирующие агенты, возможно, что они "случайные", т. е. выполняют иные функции, а нуклеирующая активность является лишь побочным эффектом [19].

В гемолимфе устойчивого к замерзанию литорального моллюска *Melampus bidentatus* в зимний период обнаружен высокомолекулярный (бо-



Температура нуклеации серийно разведенных образцов гемолимфы устойчивых к замерзанию жуков *E. blanchardi* [42]. Рядом с маркером \diamond указан фактор разведения гемолимфы.

Nucleation temperature of serially diluted samples of *E. blanchardi* freeze-tolerant beetles haemolymph [42]. Near the \diamond marker the haemolymph dilution factor is noted.

capable to initiate the crystallization near -10°C , that the same as freezing temperature of larvae ($-9,5^{\circ}\text{C}$) and rather strongly differs from haemolymph freezing temperature (-18°C) [21].

High crystallization temperature of the intact tardigrade *Adorybiotus coronifera* confirms the presence in body liquids the nucleating agents, inactivated at the temperature above 68°C , that testifies about their protein nature. Gel chromatography of homogenates derived from *A. coronifera* shows that molecular mass of nucleating agents of tardigrades should be above 200 kDa [36].

The common drupe *Lithobius forficatus* is freeze-tolerant in winter. Tursman D. *et al.* [33] suggested the presence of nucleators in the organism of *L. forficatus* in winter, however their nature has not been described. It can not be ruled out that tolerance to freezing in *L. forficatus* nevertheless depends on inoculative freezing. But if in the organism of this centipede the nucleating agents are present, probably they are 'random', *i. e.* perform other functions, and nucleating activity is only a side effect [19].

In haemolymph of the freeze-tolerant littoral mollusc *Melampus bidentatus* in winter time a high-molecular (above 3,500 kDa) thermo-sensitive nucleating agent was observed [14], however its nucleating activity was low-sensitive to protease action. If molluscs' nucleators are lipoglycoproteins, similar to bacterial nucleators [32], probably carbohydrate and/or lipid parts of complex screen the cleavage sites for

лее 3500 кДа) термочувствительный нуклеирующий агент [14], однако его нуклеирующая активность малочувствительна к действию протеазы. Если нуклеаторы моллюсков являются липогликопротеинами, подобно бактериальным нуклеаторам [32], то возможно углеводная и/или липидная части комплекса экранируют сайты расщепления для протеаз. Подобное предположение было высказано в отношении нуклеатора древесной лягушки, который некоторые протеазы не способны инактивировать [28].

Гемолимфа устойчивой к замерзанию голубой мидии *Mytilus edulus* также содержит нуклеаторы небактериального происхождения [18]. В зимний период нуклеирующая активность в гемолимфе мидий повышается, однако при их содержании в лабораторных условиях ни температура, ни фотопериод на температуру кристаллизации гемолимфы не влияют. Однако Theede H. и Stein U. [30] на том же объекте показали, что короткий фотопериод и низкая температура способствуют накоплению нуклеирующих агентов у мидий летом и, напротив, высокая температура и длинный фотопериод зимой приводят к исчезновению нуклеаторов из гемолимфы.

У устойчивого к замерзанию литорального двустворчатого моллюска митилиды *Geukensia demissa* в гемолимфе не обнаружено нуклеирующих агентов, однако в его жабрах выявлена ледонуклеирующая бактерия *Pseudomonas fulva* [17]. Подобные симбиотические отношения описаны и для амфибий (см. ниже).

БН позвоночных

Нуклеирующий агент из плазмы лягушки *R. sylvatica* инициирует нуклеацию при $-7,5^{\circ}\text{C}$ и утрачивает активность при 87°C [28], а также при обработке растворами 5% HCl, 7 М мочевины и некоторыми протеазами. Эти данные могут вполне обосновывать белковую природу нуклеатора из плазмы *R. sylvatica*. Добавление к плазме лягушек N-бромосукцинимиды, который окисляет индольные группы триптофана и тирозина, резко снижало температуру кристаллизации, что свидетельствует о важной роли этих аминокислот в формировании и/или поддержании активной конформации нуклеатора.

В природе древесные лягушки обычно контактируют со льдом, поэтому для них характерно инокулятивное замерзание при -1°C . Однако при охлаждении в лабораторных условиях сухой лягушки нуклеация не происходит, а жидкости тела животного сильно переохлаждаются. Хотя температура нуклеации нуклеирующего агента *R. sylvatica* существенно выше, чем температура иноку-

протеазы. A similar suggestion was expressed as for the nucleator of the wooden frog, which some proteases could inactivate [28].

Haemolymph of the tolerant to freezing blue mussel *Mytilus edulus* also contains nucleators of non-bacterial origin [18]. In winter time nucleating activity in haemolymph of mussels increases, however under laboratory conditions neither temperature, nor photoperiod affect haemolymph crystallization temperature. However Theede H. and Stein U. [30] in the same object showed that short photoperiod and low temperature stimulated accumulation of nucleating agents in mussels in summer and, to the contrary, high temperature and long photoperiod in winter resulted in disappearance of nucleators from haemolymph.

In the tolerant to freezing littoral clam *Geukensia demissa* no nucleating agents were observed, however in its gills the *Pseudomonas fulva* [17] ice-nucleating bacterium was found. Similar symbiotic relationships were described for amphibia (see below).

INPs of vertebrates

A nucleating agent from the frog *R. sylvatica* plasma initiates nucleation at -7.5°C and loses activity at 87°C [28] and also after treatment with 5% HCl, 7 M urea and some proteases. These data can completely substantiate a protein nature of nucleator from *R. sylvatica* plasma. Adding to frog plasma N-bromosuccinimide, oxidating indole groups of tryptophan and tyrosine, sharply decreased crystallization temperature that testified to an important role of these amino acids in formation and/or the supporting of nucleator active conformation.

In the nature the wooden frogs usually are in contact with ice, therefore, inoculative freezing at -1°C is characteristic for them. However during cooling of a dry frog under laboratory conditions the nucleation does not occur and animal liquids are strongly supercooled. Although the nucleating agent nucleation temperature of *R. sylvatica* was significantly higher than the temperature of inoculative freezing, it could perform "safety" function if inoculative freezing did not take place under any reasons.

It is also known that the frog *R. sylvatica* uses nucleating bacteria as symbions [16]. There were able for nucleation initiation 13 strains of *Pseudomonas fluorescens*, 4 strains of *Pseudomonas putida* and 2 strains of *Enterobacter agglomerance*, isolated from intestine of *R. sylvatica*. It was the first mention about nucleating activity of *P. putida* species. It is noteworthy that judging by the nucleation temperature and ability to cause D_2O nucleation, these bacteria have nucleators of A class [31].

ляционного замерзания, он может выполнять функцию "подстраховки", если инокуляционное замерзание в силу каких-либо причин не произошло.

Известно также, что лягушки *R. sylvatica* используют нуклеирующие бактерии в качестве симбионтов [16]. К инициации нуклеации оказались способны 13 штаммов *Pseudomonas fluorescens*, 4 штамма *Pseudomonas putida* и 2 штамма *Enterobacter agglomerance*, выделенных из кишечника *R. sylvatica*. Это первое сообщение о нуклеирующей активности у вида *P. putida*. Примечательно, что судя по температуре нуклеации и способности вызывать нуклеацию D₂O, эти бактерии обладают нуклеаторами класса А [31]. *E. agglomerance* и *Erwinia herbicola* являются по сути одним и тем же видом. Исторически сложилось так, что если их выделяли из растений, то использовали название *E. herbicola*, а, если из животных, то называли *E. agglomerance* [3, 4].

Представляет интерес также сообщение о наличии достаточно мощных нуклеирующих агентов не только в плазме крови, но и в некоторых тканях и органах – печени, кожи, скелетных мышцах и кишечнике как устойчивых к замерзанию, так и чувствительных к замерзанию лягушек [7]. Природа, структура и биологическое значение этих агентов пока не изучены.

В начале 90-х годов появилось сообщение о наличии нуклеирующих агентов, чувствительных к тепловой обработке, действию HCl и перйодата, в сыворотке личинок расписной черепахи *Chrysemys picta* [29]. Авторы даже предложили считать наличие специфичных БН в крови одним из ключевых факторов в эволюции устойчивости к замерзанию у позвоночных и одним из критериев устойчивости к замерзанию, но впоследствии эти данные не подтвердились. В сыворотке 21-го вида других позвоночных, включая устойчивых к замерзанию коробчатую черепаху *Terrapin carolina* и подвязочную змею *Thammophis sirtalis*, какая-либо нуклеирующая активность не выявлена. Более того, личинки *C. picta*, вероятно, выживают в зимний период благодаря переохлаждению [8]. Парадокс состоит в том, что БН крови лягушек и черепах активны при температуре, которая на 2–4°C ниже минимальной температуры выживания животных [7]. Конечно, можно предположить, что снижение нуклеирующей активности агентов *in vitro* может быть обусловлено следующими причинами: 1) отсутствием кооперативных взаимодействий с мембранами эпителиальных клеток сосудов; 2) избыточным переохлаждением из-за малого объема образцов; 3) неоптимальными условиями хранения образцов крови. Однако эти предположения не подтверждены. Не исключено,

E. agglomerance and *Erwinia herbicola* are essentially the same species. For historical reasons if they were isolated from plants then they were defined as *E. herbicola* and if from animals they were called as *E. agglomerance* [3, 4].

The report about the presence of rather powerful nucleating agents not only in blood plasma, but also in some tissues and organs (liver, skin, skeletal muscles, intestinal) both tolerant to freezing and sensitive to freezing frogs is of an interest [7]. The nature, structure and biological value of these agents have not been studied yet.

In the early 1990s the report about the presence of nucleating agents, sensitive to heat treatment, action of HCl and periodate, in larva serum of the painted turtle *Chrysemys picta* [29], appeared. The authors even suggested considering the presence of specific INPs in blood as one of key factors in evolution of tolerance to freezing, but later these data were not confirmed. In sera of 21 species of other vertebrates, including tolerant to freezing the box turtle *Terrapin carolina* and the ribbon snake *Thammophis sirtalis* no nucleating activity was found. Moreover *C. picta* larvae probably survive due to supercooling in winter [8]. Paradox is that INPs of frog and turtle blood are active under the temperature, which on 2–4°C below of animal minimal survival temperature [7]. Certainly it may be suggested that decreasing the nucleating activity of agents *in vitro* may be due to the following reasons: 1) the absence of cooperative interactions with membranes of epithelial cells of vessels; 2) extra supercooling due to small size of samples 3) non-optimal conditions of blood sample storage. However these suppositions were not confirmed. One cannot rule out that the nucleators of these animals are 'random' nucleators [19].

Thus, biological nucleation has remained a poorly studied phenomenon in animals. INPs of animal origin have obviously common characteristics with bacterial nucleators. However in contrast to bacterial nucleators, more detailed studied, animal nucleators have their peculiarities. The task about their possible usage in biotechnology also has remained open.

References

1. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of intertidal invertebrates tolerant to freezing // *Cryo-Letters*.– 1982.– Vol. 3, N5.– P. 287.
2. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of an intertidal mollusc tolerant to freezing // *Experientia*.– 1982.– Vol. 38, N12.– P. 1456–1457.

что нуклеаторы этих животных являются так называемыми случайными нуклеаторами [19].

Таким образом, биологическая нуклеация у животных остается малоизученным явлением. Очевидно, что БН животного происхождения имеют общие характеристики с бактериальными нуклеаторами. Однако в отличие от бактериальных нуклеаторов, которые исследованы более детально, нуклеаторы животных имеют свои особенности. Вопрос об их возможном использовании в биотехнологии также остается открытым.

Литература

1. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of intertidal invertebrates tolerant to freezing // *Cryo-Letters.*— 1982.— Vol. 3, N5.— P. 287.
2. Aunaas T. Nucleating agents in the haemolymph of an intertidal mollusc tolerant to freezing // *Experientia.*— 1982.— Vol. 38, N12.— P. 1456–1457.
3. Beji A., Mergaert J., Gavini F. et al. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* and *Enterobacter agglomerance* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data // *Int. J. Syst. Bacteriol.*— 1988.— Vol. 38, N1.— P. 77–88.
4. Brenner D.J., Fanning G.R., Knutson J.K. et al. Attempts to classify *Herbicola* group – *Enterobacter agglomerance* strains by deoxyribonucleic acid hybridization and phenotypic tests // *Int. J. Syst. Bacteriol.*— 1984.— Vol. 34, N1.— P. 45–55.
5. Chino H. Lipid transport: Biochemistry of hemolymph lipophorin // In: *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* / Eds. G.A. Kerkut, L.I. Gibert.— Oxford, New York, Paris: Pergamon Press, 1985.— Vol. 10.— P. 115–135.
6. Chino H., Kitazawa K. Diacylglyceride carrying proteins of hemolymph of locusts and some insects // *J. Lipid. Res.*— 1981.— Vol. 22, N5.— P. 1041–1052.
7. Costanzo J.P., Lee R.E.Jr. Mini-review: ice nucleation in freeze-tolerant vertebrates // *Cryo-Letters.*— 1996.— Vol. 17, N3.— P. 111–118.
8. Costanzo J.P., Litzgus J.D., Iverson J.B. et al. Seasonal changes in physiology and development of cold hardiness in the hatchling painted turtle *Chrysemys picta* // *J. Exp. Biol.*— 2000.— Vol. 203, N22.— P. 3459–3470.
9. Duman J.G. Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods // *Annu. Rev., Physiol.*— 2001.— Vol. 63.— P. 327–357.
10. Duman J.G., Morris J. P., Castellino F. J. Purification and composition of an ice nucleating protein from queens of the hornet *Vespula maculata* // *J. Comp. Physiol.*— 1984.— Vol. B154, N1.— P. 79–83.
11. Duman J.G., Patterson J. L. The role of ice-nucleators in the frost tolerance of overwintering queens of the bald faced hornet // *Comp. Biochem. Physiol.*— 1978.— Vol. 59A, N1.— P. 69–72.
12. Duman J.G., Wu D.W., Yeung K.L. et al. Hemolymph proteins involved in the cold tolerance of terrestrial arthropods: Antifreeze and ice nucleator proteins // In: *Water and Life* / Eds. G.N. Somero, C.B. Osmond, C.L. Bolis.— Berlin: Springer Verlag, 1992.— P. 282–300.
13. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // *FASEB J.*— 1993.— Vol. 7, N14.— P. 1338–1343.
14. Hayes D.R., Loomis S.H. Evidence for a proteinaceous ice nucleator in the haemolymph of the pulmonate gastropod *Melampus bidentatus* // *Cryo-Letters.*— 1985.— Vol. 6, N6.— P. 418–421.
15. Kozloff L.M., Turner M.A., Arellano F. et al. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria // *J. Bacteriol.*— 1991.— Vol. 173, N6.— P. 2053–2060.
16. Lee M.R., Lee R.E.Jr., Strong-Gunderson J.M. et al. Isolation of ice-nucleating active bacteria from the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica* // *Cryobiology.*— 1995.— Vol. 32, N4.— P. 358–365.
17. Loomis S.H., Zinser M. Isolation and identification of an ice-nucleating bacterium from the gills of the intertidal bivalve mollusc *Geukensia demissa* // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*— 2001.— Vol. 261, N2.— P. 225–235.
18. Lundheim R. Ice nucleation in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Marine Biology.*— 1997.— Vol. 128, N2.— P. 267–271.
19. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*— 2002.— Vol. 357, N1423.— P. 937–943.
20. Mackenzie A. P. Non-equilibrium freezing behavior of aqueous systems // *Phil. Trans. R. Soc. London.*— 1977.— Vol. B278, N1085.— P. 167–189.

13. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // *FASEB J.*— 1993.— Vol. 7, N14.— P. 1338–1343.
14. Hayes D.R., Loomis S.H. Evidence for a proteinaceous ice nucleator in the haemolymph of the pulmonate gastropod *Melampus bidentatus* // *Cryo-Letters.*— 1985.— Vol. 6, N6.— P. 418–421.
15. Kozloff L.M., Turner M.A., Arellano F. et al. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria // *J. Bacteriol.*— 1991.— Vol. 173, N6.— P. 2053–2060.
16. Lee M.R., Lee R.E.Jr., Strong-Gunderson J.M. et al. Isolation of ice-nucleating active bacteria from the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica* // *Cryobiology.*— 1995.— Vol. 32, N4.— P. 358–365.
17. Loomis S.H., Zinser M. Isolation and identification of an ice-nucleating bacterium from the gills of the intertidal bivalve mollusc *Geukensia demissa* // *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*— 2001.— Vol. 261, N2.— P. 225–235.
18. Lundheim R. Ice nucleation in the blue mussel (*Mytilus edulis*) // *Marine Biology.*— 1997.— Vol. 128, N2.— P. 267–271.
19. Lundheim R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*— 2002.— Vol. 357, N1423.— P. 937–943.
20. Mackenzie A. P. Non-equilibrium freezing behavior of aqueous systems // *Phil. Trans. R. Soc. London.*— 1977.— Vol. B278, N1085.— P. 167–189.
21. Mugnano J.A., Lee R.E., Taylor R.T. Fat body cells and calcium phosphate spherules induce ice nucleation in the freeze tolerant larvae of the gall fly *Eurosta solidaginis* (*Diptera, tephritidae*) // *J. Exp. Biol.*— 1996.— Vol. 199, N2.— P. 465–471.
22. Neven L.G., Duman J.G., Beals J.M. et al. Overwintering adaptations of the stag beetle, *Ceruchus piceus*: removal of ice nucleators in winter to promote supercooling // *J. Comp. Physiol.*— 1986.— Vol. B156, N7.— P. 707–716.
23. Neven L., Duman J.G., Low M.G. et al. Purification and characterization of an insect haemolymph lipoprotein ice nucleator: Evidence for the importance of phosphatidylinositol and apolipoprotein in the ice nucleator activity // *J. Comp. Physiol.*— 1989.— Vol. 159, N1.— P. 71–82.
24. Pattnaik N.M., Mundall E.C., Trambysti B.G. et al. Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of *Manduca sexta* // *Comp. Biochem. And Physiol.*— 1979.— Vol. 63B, N5.— P. 469–476.
25. Shapiro J. P., Law J. H., Well M. A. Lipid transport in insects // *Ann. Rev. Entomol.*— 1988.— Vol. 28, N3.— P. 297–318.
26. Somme L., Zachariassen K. E. Adaptation to low temperature in high altitude insects from Mount Kenya // *Ecol. Entomol.*— 1981.— Vol. 6, N2.— P. 199–204.
27. Somme L., Zachariassen K. E. Adaptation to low temperature in high altitude insects from Mount Kenya // *Ecol. Entomol.*— 1981.— Vol. 6, N2.— P. 199–204.
28. Storey K.B., Baust J.G., Wolanczyk J.P. Biochemical modification of plasma ice nucleating activity in a freeze-tolerant frog // *Cryobiology.*— 1992.— Vol. 29, N3.— P. 374–384.
29. Storey K.B., McDonald D.G., Duman J.G. et al. Blood chemistry and ice nucleating activity in hatchling painted turtles // *Cryo-Letters.*— 1991.— Vol. 12, N6.— P. 351–358.
30. Theede H., Stein U. Further studies on frost protection in *Mytilus edulis* from the western Baltic Sea // 21st Meeting of EMBS. Gdansk, 14–19 September 1986.— Gdansk, 1986.— P. 173–181.
31. Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M. Three separate classes of bacterial ice nucleation structures // *J. Bacteriol.*— 1990.— Vol. 172, N5.— P. 2521–2526.
32. Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M. Components of ice nucleation structures of bacteria // *J. Bacteriol.*— 1991.— Vol. 173, N20.— P. 6515–6527.
33. Tursman D., Duman J.G., Knight C.A. Freeze tolerance adaptations in the centipede, *Lithobius forficatus* // *J. Exp. Zool.*— Vol. 268, N5.— P. 347–353.
34. Van der Laak S. Physiological adaptations to low temperature in freezing tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // *Comp. Biochem. Physiol.*— 1982.— Vol. 73A, N6.— P. 613–620.
35. Warner D. T. Some possible relationships of carbohydrates and other biological components with the water structure at 37°C // *Nature.*— 1962.— Vol. 196, N10.— P. 1055–1058.
36. Westh P., Kristiansen J., Hvidt A. Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade *Adorybiotus coronifer* // *Comp. Biochem. Physiol. Part A.*— 1991.— Vol. 99, N3.— P. 401–404.
37. 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.
38. Xu Lei, Neven L. G., Duman J. G. Hormonal control of hemolymph lipoprotein ice nucleators in overwintering freeze-susceptible larvae of the stag beetle *Ceruchus piceus*: adipokinetic hormone and juvenile hormone // *J. Comp. Physiol.*— 1990.— Vol. B160, N1.— P. 51–59.
39. Yeung K.L., Wolf E.E., Duman J.G. A scanning tunneling microscopy study of an insect lipoprotein ice nucleator // *J. Vac. Sci. Technol. B.*— 1991.— Vol. 9, N2.— P. 1197–1201.

33. *Tursman D., Duman J.G., Knight C.A.* Freeze tolerance adaptations in the centipede, *Lithobius forficatus* // J. Exp. Zool.– Vol. 268, N5.– P. 347–353.
34. *Van der Laak S.* Physiological adaptations to low temperature in freezing tolerant *Phyllodecta laticollis* beetles // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N6.– P. 613–620.
35. *Warner D. T.* Some possible relationships of carbohydrates and other biological components with the water structure at 37°C // Nature.– 1962.– Vol. 196, N10.– P. 1055–1058.
36. *Westh P., Kristiansen J., Hvidt A.* Ice-nucleating activity in the freeze-tolerant tardigrade *Adorybiotus coronifer* // Comp. Biochem. Physiol. Part A.– 1991.– Vol. 99, N3.– P. 401–404.
37. *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.
38. *Xu Lei, Neven L. G., Duman J. G.* Hormonal control of hemolymph lipoprotein ice nucleators in overwintering freeze-susceptible larvae of the stag beetle *Ceruchus piceus*: adipokinetic hormone and juvenile hormone // J. Comp. Physiol.– 1990.– Vol. B160, N1.– P. 51–59.
39. *Yeung K.L., Wolf E.E., Duman J.G.* A scanning tunneling microscopy study of an insect lipoprotein ice nucleator // J. Vac. Sci. Technol. B.– 1991.– Vol. 9, N2.– P. 1197–1201.
40. *Zachariassen K.E.* Nucleating agents in cold-hardy insects // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N5.– P. 557–562.
41. *Zachariassen K. E.* Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev.– 1985.– Vol. 65, N4.– P. 799–832.
42. *Zachariassen K. E., Hammel H. T.* Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing // Nature.– 1976.– Vol. 262, N21.– P. 285–287.
43. *Zachariassen K.E., Kristiansen E.* Ice nucleation and antinucleation in nature // Cryobiology.– 2000.– Vol. 41, N4.– P. 257–279.
40. *Zachariassen K.E.* Nucleating agents in cold-hardy insects // Comp. Biochem. Physiol.– 1982.– Vol. 73A, N5.– P. 557–562.
41. *Zachariassen K. E.* Physiology of cold tolerance in insects // Physiol. Rev.– 1985.– Vol. 65, N4.– P. 799–832.
42. *Zachariassen K. E., Hammel H. T.* Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing // Nature.– 1976.– Vol. 262, N21.– P. 285–287.
43. *Zachariassen K.E., Kristiansen E.* Ice nucleation and antinucleation in nature // Cryobiology.– 2000.– Vol. 41, N4.– P. 257–279.

Accepted in 17.08.2010

*Поступила 17.08.2010
Рецензент В.В. Рязанцев*