

**Антифризные белки.****Сообщение III: Регуляция, происхождение, стабильность и применение****Antifreeze Proteins.****Report III: Regulation, Origin, Stability and Application**

В работе представлены существующие на данный момент сведения относительно происхождения, регуляции, стабильности и использования антифризных белков.

**Ключевые слова:** антифризные белки, эволюция, криоконсервирование, регуляция.

В роботі подано накопичені на теперішній час дані щодо походження, регуляції, стабільності та використання антифризних білків.

**Ключові слова:** антифризні білки, еволюція, криоконсервування, регуляція.

Information compiled up to the present on origin, regulation, stability and usage of antifreeze proteins is presented in the work.

**Key-words:** antifreeze proteins, evolutions, cryopreservation, regulation.

В предыдущем сообщении (№2, 2009 г.) мы попытались обобщить сведения по классификации антифризных протеинов (АФП). В настоящей работе приведены данные о происхождении, регуляции, стабильности и возможных путях применения АФП.

In previous report (№2, 2009) we tried to summarise the information about the antifreeze protein (AFP) classification. In this paper we present the data about the origin, regulation, stability and possible ways for AFPs application.

**Регуляция синтеза**

Экспериментально установлено, что при акклимации низкая температура или короткий фотопериод индуцируют синтез АФП у насекомых *Meracanta contracta* [11], *Tenebrio molitor* [34], *Dendroides canadensis* [12, 19]. Однако полученные данные противоречивы. Личинки последних возрастов *T. molitor* обладают АФП даже при благоприятной температуре 22°C [17]. Тем не менее искусственная холододовая акклимация приводит к многократному увеличению содержания м-РНК АФП и величин значений термогистерезиса у личинок любого возраста. При окукливании синтез м-РНК АФП резко падает даже при условии холодной акклимации, хотя уже присутствующие АФП обеспечивают довольно высокий уровень термогистерезиса. В эксперименте любое внешнее воздействие, замедляющее рост личинок, вызывало увеличение термогистерезиса, поэтому авторы предположили, что прекращение развития личинок является первичным фактором регуляции синтеза АФП у *T. molitor*. У личинок *Choristoneura fumiferana* транскрипты

**Synthesis regulation**

Under acclimation either a low temperature or short photoperiod were experimentally established to induce AFPs synthesis in the insects *Meracanta contracta* [11], *Tenebrio molitor* [34], *Dendroides canadensis* [12, 19]. However the obtained data are contradictory. The latest instar larvae of *T. molitor* have AFPs even under favourable temperature of 22°C [17]. Nevertheless an artificial cold acclimation results in a manifold increase in m-RNA content of AFPs and thermohysteresis values in any instar larvae. During pupation the AFP m-RNA synthesis sharply decreases even under cold acclimation, although the presented AFPs provide quite a high level of thermohysteresis. In the experiment any external effect, slowing down the larvae growth augmented thermohysteresis, therefore the authors suggested the ceasing of larvae development to be a primary factor in AFPs synthesis regulation in *T. molitor*. In the larvae *Choristoneura fumiferana* the transcripts of some genes of AFPs family are found in the 1<sup>st</sup> instar larvae, normally existing only in summer [10], i.e. in contrast

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

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

\* 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

\* 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

некоторых генов семейства АФП обнаруживаются у личинок 1-го возраста, которые в норме существуют только летом [10], т. е. в отличие от более ранних предположений [11, 12, 19, 34], экспрессия генов АФП регулируется скорее онтогенетически, а не сезонно низкими температурами. Известно, что ювенильный гормон индуцирует диапаузу личинок. Возможно, что он, кроме индукции диапаузы, участвует также в инициации холодоустойчивости. Например, у *D. canadensis* ювенильный гормон стимулирует продукцию АФП [20].

В крови нототениевых рыб уровень антифризных гликопротеидов (АФГП) снижается при акклимации (4°C) в течение 16 недель, но количество крупных компонентов АФГП уменьшается незначительно (на 20%), в отличие от малых АФГП (на 60%) [23]. А в крови бельдюги *Lycodichthys dearborni* высокий уровень (более 20 мг/мл) семейства АФП III, состоящего из трех основных и пяти минорных компонентов, сохраняется на протяжении года [48].

На мальках нототениевых рыб *Gymnodraco acuticeps*, *Pagothenia borchgrevinki* и *Pleuragramma antarcticum* показано, что далеко не все антарктические рыбы на ранних стадиях жизненного цикла обладают АФП [9]. По-видимому, мальки рыб, у которых АФП не обнаружены, используют другие механизмы защиты.

АФП растений с двойной функцией защиты от холода и ряда патогенов накапливаются в ответ на холод, короткий фотопериод, дегидратацию, но не в ответ на патогены [18]. Так, глюконаза неакклимированной озимой ржи *Secale cereale* имела чрезвычайно низкую антифризную активность по сравнению с глюконазами, синтезирующимися в холодоакклимированных растениях [51]. Однако один из генов АФП пшеницы *Triticum aestivum* экспрессируется не только во время холодовой акклимации, но и под действием фитогормонов (жасмоновой кислоты и этилена), которые участвуют в защите растений от патогенов [44]. АФП с невысокой термогистерезисной активностью паслена *Solanum dulcamara*, моркови *Daucus carota* и плевела *Lolium perenne* [21, 35, 42] накапливаются только после ноября. Это указывает на то, что холодовая акклимация является индуктором их синтеза.

### Стабильность

АФП имеют разную стабильность. Например, ингибирующая рекристаллизацию активность экстракта листьев и коры форсинии *Forsythia suspensa* устойчива к кипячению и действию восстанавливающих агентов [41], а АФП снежной блохи термолabilен как и один из АФП камбалы, денатурирующий при комнатной температуре [16, 30]. АФП *L. perenne* также сохраняет способность ингибировать рекристаллизацию после кипячения [35];

to earlier suggestions [11, 12, 19, 34] the expression of AFPs genes is regulated rather ontogenetically, than the seasonally low temperatures. Juvenile hormone is known to induce the larvae diapause. In addition to diapause induction it possibly participates in cold-resistance initiating as well. For example in *D. canadensis* a juvenile hormone stimulates AFPs production [20].

In blood of notothenioid fish the level of antifreeze glycoproteids (AFGP) reduces under acclimation (4°C) during 16 weeks, but a number of large AFGP components slightly decreases (by 20%), in contrast to small ones (by 60%) [23]. In blood of eel pout *Lycodichthys dearborni* a high level (more than 20 mg/ml) of AFPs III family, consisting of three main and five minor components, is preserved over one year [48].

In notothenioid young fish *Gymnodraco acuticeps*, *Pagothenia borchgrevinki* and *Pleuragramma antarcticum* there was shown, that only some of Antarctic fish species have AFPs at early stages of a vital cycle [9]. Apparently, the young fish, in which no AFPs were found, used other protective mechanisms.

Plant AFPs with double protective function against cold and some pathogens are accumulated in response to cold, short photoperiod, dehydration, but not to pathogens [18]. Thus, the gluconase of non-acclimated winter rye *Secale cereale* had an extremely low antifreeze activity compared to gluconases, being synthesised in cold-acclimated plants [51]. However one of genes of wheat *Triticum aestivum* AFPs is expressed not only during cold acclimation, but under phytohormones (jasmonic acid and ethylene) effect as well, participating in plant protection against pathogens [44]. AFPs with a low thermohysteresis activity of nightshade *Solanum dulcamara*, carrot *Daucus carota* and perennial grass *Lolium perenne* [21, 35, 42] are accumulated only after November. This indicates to the fact, that a cold acclimation is their synthesis inducer.

### Stability

AFPs have different stability rate. For example, a recrystallisation-inhibiting activity of *Forsythia suspensa* leaves and cortex extract is resistant to boiling and reducing agent effect [41], but AFP of snow flea is thermolabile, as for one of flounder AFPs, denaturising at room temperatures [16, 30]. *L. perenne* AFP also preserves the capability for recrystallisation inhibiting after boiling [35]; AFP of Antarctic bacterium *Flavobacterium xanthum* loses activity under heating over 50°C [24]. The capability of wheat AFPs to preserve the ice-cream consistence during storage is not lost during adding the AFP-containing extracts as a part of ice-cream before pasteurisation [37].

АФП антарктической бактерии *Flavobacterium xanthum* утрачивает активность при нагревании свыше 50°C [24]. Способность АФП пшеницы сохранять консистенцию мороженого в процессе хранения не теряется при добавлении экстрактов, содержащих АФП, в состав мороженого до пастеризации [37].

Для некоторых белков выявлены ключевые положения аминокислотных остатков, отвечающих за стабильность. Так, отрицательные заряды глутаминов в положениях 23 и 36 необходимы для термостабильности антифризного полипептида американской бельдюги *Macrozoarces americanus* [26].

### Эволюция

Наличие АФП считается более прогрессивным признаком по сравнению с накоплением полиолов и сахаров, хотя не все исследователи согласны с этим утверждением [36].

Однако АФП из представителей далеких друг от друга систематических таксонов не обнаруживают гомологии и имеют различную третичную структуру [4]. Эта группа белков – прекрасный пример параллельной и конвергентной эволюции на молекулярном уровне.

Происхождение АФП является предметом дискуссий. Предположительно, гидрофильные АФП насекомых произошли от белков, ответственных за удержание воды в организме при засухе в жарких регионах, где обитали предки холодоустойчивых видов [5, 40].

Существует мнение, что ген АФГП нототениевых рыб произошел от гена панкреатического трипсинагена [7]. В первичный ген АФГП вошли 5'-конец древнего гена трипсинагена, который обеспечивает секреторный сигнал, и 3'-нетранслируемая область. Впоследствии элемент, кодирующий Thr-Ala-Ala гена-предка, амплифицировался, что обусловило появление новой функции белка. Именно эти повторы ответственны за 4–7% дивергенции между генами АФГП и трипсинагена. Для секреции АФГП из поджелудочной железы 5'-конец по-прежнему необходим. Арктические и антарктические виды рыб содержат практически идентичные компоненты гликопротеинов [32]. В то же время ген АФГП арктической трески *Dissostichus mawsoni* не гомологичен гену трипсинагена [8]. Гены АФГП нототениевых и тресковых имеют разную интрон-экзонную организацию и различные спейсерные последовательности, что является причиной различного процессинга белков-предшественников. Последовательности, кодирующие повторы Thr-Ala/Pro-Ala, также отличаются. Вышеприведенные факты свидетельствуют о независимом происхождении представителей АФГП в разных таксонах рыб и последующей конвергентной эволюции.

For some proteins there were revealed the key positions of aminoacid residues responsible for stability. Thus, negative charges of glutamines in 23 and 36 positions are necessary for thermostability of antifreeze polypeptides of ocean pout *Macrozoarces americanus* [26].

### Evolution

AFPs presence is considered as more progressive feature compared to polyol and sugar accumulation, although this statement is not shared by all the researchers [36].

However the AFPs from the representatives of systematic taxons, being far from each other, do not reveal the homology and have different tertiary structure [4]. This protein group is an excellent example of parallel and convergent evolution in molecular level.

AFPs origin is a matter of argument. Hydrophilic AFPs of insects are suggested as originated from proteins, responsible for water retention in organism under drought in hot regions, where progenitors of cold-resistant species inhabited [5, 40].

One believes, that AFGP gene of notothenioid fish originated from that of pancreatic trypsinogen [7]. A primary AFGP gene comprised the 5'-end of ancient gene of trypsinogen, providing an excretory signal, and a 3'-untranslated region. Afterwards the element, encoding Thr-Ala-Ala of gene-progenitor was amplified, that stipulated the appearance of new protein function. Namely these repeats are responsible for 4–7% divergence between AFGP and trypsinogen genes. For AFGP secretion from pancreas the 5'-end is still necessary. Arctic and Antarctic fish species comprise practically identical components of glycoproteins [32]. At the same time AFGP gene of Arctic cod *Dissostichus mawsoni* is not homologous to trypsinogen gene [8]. AFGP genes of notothenioid and cod species have different intron-exonic organisation and various spacer sequences, being the reason for different processing of protein-precursors. The sequences, encoding the Thr-Ala/Pro-Ala repeats, differ as well. The mentioned above facts testify to an independent origin of AFGP representatives in various fish taxons and following convergent evolution.

The homology between AFP I gene and those of chorion and keratin proteins of Atlantic snailfish *Liparis atlanticus*, expressing in liver, was established. Possibly, the AFP I progenitors are among these genes, and the protein genes with antifreeze activity appeared as a result of reading frame shift [14].

Phylogenetic analysis demonstrates all the AFPsII (Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent ones) as originated from the common progenitor and only later they developed different mechanisms of ice-binding

Установлена гомология между геном АФП I и генами белков хориона и кератина липариса *Liparis atlanticus*, которые экспрессируются в печени. Возможно, среди этих генов находятся предки АФП I, и в результате сдвига рамки считывания появились гены белков с антифризной активностью [14].

Филогенетический анализ показывает, что все АФП II ( $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые и  $\text{Ca}^{2+}$ -независимые) произошли от общего предка и уже впоследствии они развили различные механизмы связывания со льдом [27]. Таким предком может быть сахаросвязывающий белок лектин. Возможно, связывающийся со льдом домен АФП II развился в ходе молекулярной эволюции из углевод-связывающего сайта лектино-подобного предка [15]. Однако структура экзонов и интронов гена АФП II морского ворона указывает на его большее сходство с геном панкреатического литостатина, а не с геном лектина [29].

АФП III рыб гомологичен С-концевому участку синтетазы сиаловой кислоты млекопитающих [2]. Гомология особенно сильно выражена в районе плоской поверхности, связывающейся со льдом. На основании этих данных можно дополнить список возможных “родственников” АФП из белков, взаимодействующих с сахарами и полисахаридами. Один из генов АФП III бельдюги *Lycodichthys dearborni* кодирует 12 tandemных повторов, каждый из которых транслируется в 7 кДа молекулу АФП III [52]. Организация этого гена аналогична организации генов АФГП. АФП III и АФГП отличаются по составу и структуре, и они синтезируются у рыб из различных систематических таксонов. Сходная структура генов этих совершенно различных полипептидов свидетельствует о наличии у рыб общего механизма организации участков геномов, отвечающих за приспособление к низким экстремальным условиям полярных ареалов.

АФП растений выполняют и вторую функцию защиты от психрофильных патогенов [51]. Остается открытым вопрос, какая из функций является первичной в эволюционном плане. АФП с низкой термогистерезисной активностью *S. dulcamara* [21] сходен с транскрипционными факторами растений, регулирующими экспрессию белков, связанных с патогенезом, что также дополняет список АФП с возможной двойной функцией.

### Использование

В течение последних 10 лет установлено, что эффект АФП на жизнеспособность клеток и термодинамические свойства сред и растворов во время низкотемпературного консервирования сложен и противоречив. АФП могут проявлять и защитное и цитотоксическое действие в зависимости от протокола хранения, дозы и типа АФП, состава консервирующей среды и типа биоматериала [47]. Предло-

[27]. This progenitor may be a sugar-binding lectin protein. Probably, an ice-binding AFPII domain developed during molecular evolution from a carbohydrate-binding site of lectin-like progenitor [15]. However the structure of exons and introns of sea raven AFP II gene indicates to its high affinity with that of pancreatic lithostathine, but not lectin one [29].

Fish AFP II is homologous to C-end site of mammalian sialic acid synthase [2]. The homology is especially highly expressed in the region of flat ice-binding surface. Basing on these data we may complete a list of possible AFP “relatives” from proteins, interacting with sugars and polysaccharides. One of genes of Antarctic eel pout *Lycodichthys dearborni* AFP III encodes 12 tandem repeats, each of them is translated in 7 kDa molecule of AFPIII [52]. This gene organisation is similar to that of AFGP genes. AFP III and AFGP distinguish by the composition and structure and they are synthesised in fish from different systematic taxons. A similar gene structure of these completely different polypeptides testifies to the presence in fish of common organisation mechanism of genome sites, responsible for adaptation to low extreme conditions of polar areas.

Plant AFPs accomplish the second protective function against psychrophilic pathogens as well [51]. The question about which one of functions is primary in evolutionary aspect is still open. AFP with low thermohysteresis activity of *S. dulcamara* [21] is similar to the transcription plant factors, regulating protein expression, associated to pathogenesis, that also completes the AFPs list with a possible double function.

### Usage

Within recent decade the AFPs effect on cell viability and thermodynamic properties of media and solutions during low temperature preservation was established to be complicated and contradictory. AFPs may manifest both protective and cytotoxic effects dependently on storage protocol, dose and AFP type, composition of preserving medium and biomaterial type [47]. The hypothesis about the affinity and interaction of AFP-ice complexes with cell membranes and other molecular complexes in cryopreserving media was proposed [46]. When the intensity of these interactions achieves the certain level, the AFPs-ice complexes may aggregate, thereby inducing ice nucleation and losing the capability for recrystallisation inhibiting.

AFP I was applied as a natural cryoprotectant to cryopreserve the embryos of seabream *Sparus aurata* [38]. Protein was introduced into 2-cell embryos and blastulae, afterwards embryos were cooled down to 0 and  $-10^{\circ}\text{C}$ . AFPI significantly increased the embryo preservation at  $0^{\circ}\text{C}$ , especially when intro-



жена гипотеза о сродстве и взаимодействии комплексов АФП-лёд с клеточными мембранами и другими молекулярными комплексами в криоконсервирующих растворах [46]. Когда интенсивность этих взаимодействий достигает определённого уровня, комплексы АФП-лёд могут агрегировать, индуцируя таким образом нуклеацию льда и теряя способность ингибировать рекристаллизацию.

АФП I был использован в качестве естественного криопротектора для криоконсервирования эмбрионов морского караса *Sparus aurata* [38]. Белок вводили в 2-клеточные эмбрионы и бластулы, после чего эмбрионы подвергали охлаждению до 0 и  $-10^{\circ}\text{C}$ . АФП I существенно повышал сохранность эмбрионов при  $0^{\circ}\text{C}$ , особенно при введении на стадии 2 клеток (вылупляемость мальков – 100%). Результаты микроскопии по распределению АФП I после микроинъекции также подтверждают способность АФП защищать клеточные структуры, стабилизируя мембраны.

Показано, что АФП рыб стабилизируют мембраны и клетки *in vitro* во время гипотермического хранения [43], хотя механизм этой стабилизации пока не выяснен. Во время охлаждения при незамерзающих температурах  $\alpha$ -спиральный АФП типа I ингибировал утечку через модельные мембраны. При этом АФП связывался с бислоем, повышая температуру фазовых переходов в мембране и изменяя молекулярную упаковку ацильных цепей. Возможно, изменение упаковки приводит к снижению проницаемости мембраны. Полученные данные предполагают наличие гидрофобных взаимодействий между пептидом и бислоем. Способность АФП типов I, II, III и АФГП сохранять целостность мембран при гипотермическом хранении была исследована на липосомах [50]. В качестве контроля использовали альбумин. Показано, что все белки, включая альбумин, предотвращали утечку сквозь мембрану в цвиттерионных липосомах при охлаждении до температуры фазовых переходов липидов мембраны. Таким образом, способность сохранять упорядоченную структуру мембран во время фазового перехода присуща не только биологическим антифризам. Более того, АФП (но не АФГП) и альбумин индуцировали утечку сквозь мембрану еще до охлаждения в отрицательно заряженных липосомах, т. е. если мембрана содержит отрицательно заряженные полярные группы, то белки, хотя и связываются с такими мембранами, не способны сохранять их организацию и более того могут быть доступны липидному бислою, тем самым нарушая структуру мембраны и индуцируя утечку сквозь неё. Следовательно, эффективность применения АФП для защиты клеток млекопитающих зависит не только от самого белка, но и от липидного состава клеточной мембраны.

ducing at 2-cell stage (100% fry hatchability). The results of microscopy on AFPI distribution after microinjection also confirm the AFP capability to preserve cell structure via membrane stabilisation. Fish AFPs are shown to stabilise membranes and cells *in vitro* during hypothermic storage [43], although the mechanism of this stabilisation has still been unclear. During cooling at non-freezing temperatures an  $\alpha$ -helical type I AFP inhibited the leakage through model membranes. At the same time the AFP was bound to bilayer by increasing the temperature of phase transitions in membrane and changing a molecular package of acylic chains. Change in package possibly results in a decrease of membrane permeability. The data obtained assume the presence of hydrophobic interactions between peptide and bilayer. The capability of type I, II, III AFPs and AFGP to preserve the membrane integrity under hypothermic storage was studied in liposomes [50]. The albumin served as the control. All the proteins, including albumin, were shown to prevent the leakage through a membrane in zwitterions liposomes under cooling down to phase transition temperature of membrane lipids. Thus, the capability to preserve an ordered membrane structure during phase transition is inherent not only to biological antifreezes. In addition, AFP (not AFGP) and albumin induced the leakage through a membrane even prior to cooling down in negatively charged liposomes, *i.e.* if a membrane comprised the negatively charged polar groups, the proteins, although being bound to these membranes, were not capable to preserve their organisation and moreover they might be accessible for lipid bilayer thereby breaking a membrane structure and inducing leakage through it. Consequently, the efficiency of AFP application for mammalian cell protection depends not only on protein itself, but cell membrane lipid composition as well.

The efficiency of flounder AFPI was also proved in the experiments on hypothermic storage of sheep embryos ( $4^{\circ}\text{C}$  within 4 days) [3]. The index of embryo survival and the frequency of pregnancy onset do not distinguish from those in freshly isolated embryos. However, the American ocean pout AFPIII occurred to be inefficient under the same conditions. The similar results were obtained when storing bovine oocytes at  $4^{\circ}\text{C}$  within 24 hrs [39]. The presence in cryopreserving medium of flounder AFPI, sea raven AFPII or pout AFPIII provided a 4-fold augmentation of oocyte number, preserved an intact oolemma and a 3-fold one in oocyte number capable for *in vitro* maturation. The number of oocytes, fertilised after maturation, was comparable with this index in freshly isolated oocytes, meanwhile no one among the control oocytes, stored without AFP, was fertilised.

There was suggested, that the AFP expression in transgenic organisms might play a significant role

Эффективность АФП I камбалы также доказана в опытах по гипотермическому хранению эмбрионов овцы (4°C в течение 4-х суток) [3]. Показатель выживаемости эмбрионов и частота наступления беременности не отличаются от таковых у свежесодержанных эмбрионов. Однако АФП III американской бельдюги оказался не эффективным в тех же условиях. Подобные результаты получены при хранении ооцитов коров при 4°C в течение 24 ч [39]. Присутствие в консервирующей среде АФП I камбалы, АФП II морского ворона или АФП III бельдюги обеспечивало 4-кратное увеличение количества ооцитов, сохранивших интактную оолему, и 3-кратное увеличение количества ооцитов, способных созреть *in vitro*. Количество оплодотворенных после созревания ооцитов было сравнимо с этим же показателем у свежесодержанных ооцитов, тогда как ни один из контрольных ооцитов, хранившихся без АФП, не был оплодотворен.

Высказано предположение, что экспрессия АФП в трансгенных организмах может играть существенную роль при температурной адаптации холодолюбивых видов. Трансгенные табак [25] и картофель [45], а также золотые рыбки [49], экспрессирующие АФП рыб, более устойчивы к действию низких температур по сравнению с контролем. Трансгенные сорта риса, в которых удалось осуществить избыточную экспрессию АФП, способны выдерживать промерзание при -1°C в течение 24 ч и затем оттаивать без существенных повреждений [53]. Кроме того, эти растения более устойчивы к инфекциям.

Созданы трансгенные растения, экспрессирующие АФП насекомых [22]. Хотя трансгенные линии резусника *Arabidopsis* замерзают при более низких температурах, их выживаемость не отличается от выживаемости дикого типа.

Экспрессия АФП I из бронзового керчака *Myoxocephalus aeneus* в дрожжах *S. cerevisiae* повышает их устойчивость к замораживанию и усиливает способность к газопродукции не только самих дрожжей, но и замороженного сдобного теста, содержащего трансгенные линии [33].

Предпринята попытка использования АФП типов I и III в протоколе хранения сердца при -1,3°C [1]. При хранении сердца без АФП происходила кристаллизация, тогда как в присутствии АФП орган не замерзал и имел лучшие показатели деятельности (скорость сокращения, коронарный ток и давление), чем в контроле без АФП.

Созданы синтетические аналоги  $\alpha$ -спирального АФП камбалы [6]. Такие синтетические пептиды могут быть важны для исследования механизма действия биологических антифризов. Установлено, что при низких концентрациях АФП связывается посредством дипольных взаимодействий и водородных связей с призматическими поверхностями

under temperature adaptation in cold-sensitive species. A transgenic tobacco [25] and potato [45], as well as gold fish [49], expressing fish AFP are more resistant to low temperature effect compared to the control. Transgenic rice varieties, in which there was managed to realise an excessive AFP expression, were capable to survive freezing at -1°C within 24 hrs and then thawed with no drastic damages [53]. In addition, these plants are more resistant to infections.

Transgenic plants, expressing insect AFPS, have been created [22]. Although the transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* freeze at lower temperatures, their survival does not distinguish from that of wild type.

The AFPI expression from grubby *Myoxocephalus aeneus* in yeast *S. cerevisiae* increases their resistance to freezing and strengthens the capability to gas-production not only in yeast itself, but in frozen rich dough, containing transgenic lines [33].

There was attempted to use type I and III AFPs in the heart storage protocol at -1.3°C [1]. When storing heart with no AFPs the crystallisation occurred, meanwhile in AFP presence the organ did not freeze and had higher indices of activity (contractile rate, coronary flow and pressure), than in the AFP-free control.

There were created the synthetic analogues of flounder  $\alpha$ -helical AFP [6]. These synthetic peptides may be important for studying the effect mechanism of biological antifreezes. Under low concentrations the AFP was established as bound by dipole interactions and hydrogen bonds to the prismatic crystal surfaces by inhibiting its growth along the axis *a*. At the same time the crystal growth along the axis *c* is in progress. Under high concentrations the AFP interacts with all the crystal surfaces and slows down the growth along both axis. In order to find out a molecular mechanism of AFGP effect there was performed the synthesis of artificial AFGP [13]. Created artificial analogues have a molecular mass from 1.6 to 3 kDa; they are characterised by structural variations of a carbohydrate part, polypeptide backbone and amino-acid side chains. An artificially synthesised analogue AFGP was compared by the efficacy with that of natural origin [28]. These investigations demonstrated the latter being cytotoxic towards human embryonic liver and kidney cells under high concentrations. In addition, there was revealed the strengthening of apoptosis judging by a sharp increase in caspase activity. At the same time an artificial analogue AFGP was not cytotoxic for cells even under high concentrations. The remarkable fact is, that the caspase activity in cell lines, treated with artificial AFGP was even much lower, than the control values. An artificial AFGP is considered as a perspective candidate to be a new component for cryoprotective media [28]. Synthetic AFGP caused a cryoprotective effect during cryo-

кристалла, замедляя его рост по оси *a*. При этом рост кристалла по оси *c* продолжается. При высоких концентрациях АФП взаимодействует со всеми поверхностями кристалла и замедляет рост по обеим осям. Для выяснения молекулярного механизма действия АФП осуществлен синтез искусственных АФП [13]. Созданные искусственные аналоги имеют молекулярную массу от 1,6 до 3 кДа; они характеризуются структурными вариациями углеводной части, полипептидного остова и аминокислотных боковых цепей. Искусственно синтезированный аналог АФП сравнивали по эффективности действия с АФП естественного происхождения [28]. Эти исследования показали, что последний цитотоксичен по отношению к клеткам эмбриональных печени и почек человека при высоких концентрациях. Кроме того, судя по резкому повышению активности каспазы, выявлено усиление апоптоза. В то же время искусственный аналог АФП не был цитотоксичен для клеток даже в высоких концентрациях. Примечательно, что активность каспазы в клеточных линиях, обработанных искусственным АФП, была даже гораздо ниже контрольных значений. Искусственный АФП считают [28] перспективным “кандидатом” на роль нового компонента криозащитных сред. Синтетический АФП оказывал криозащитное действие во время криоконсервирования островков поджелудочной железы [31]. Криомикроскопические наблюдения показали, что рост кристаллов сильно замедлен, а образовавшиеся кристаллы не вызывали криоповреждений. Выработка инсулина островками, криоконсервированными с АФП, достоверно выше по сравнению с количеством инсулина, который секретировался островками, криоконсервированными без АФП. Показатель сохранности клеток был выше на 20%.

АФП применяются и при хранении продуктов питания. Так, добавление в мороженое экстрактов холодоакклимированной пшеницы, содержащих АФП, позволяло добиться более однородной консистенции мороженого, которое подвергалось нагреву в процессе хранения [37]. Данная добавка способна снизить уровень рекристаллизации более чем на 40%. Замороженное тесто при добавлении 15,4% АФП *D. carota* имеет более равномерную текстуру, т. к. в нем уменьшается количество замерзающей во время хранения воды [54]. Тесто получается более мягким, а объем выпекаемых изделий стабильным. Установлено, что добавка АФП на аромат и вкусовые качества не влияет.

Таким образом, в настоящее время изучение биологических антифризов расширяется и углубляется, поскольку еще многие вопросы предстоит объяснить: связь структуры и функции, регуляции экспрессии антифризов и их происхождение. Отдельной сферой исследований является прикладное использование биологических антифризов.

preservation of pancreatic islets [31]. Cryomicroscopic observations showed a strong slowing down in crystal growth and no cryodamages, caused by formed crystals. Insulin production by islets, cryopreserved with AFGP is significantly higher than insulin amount, secreted by islets cryopreserved without AFGP. The index of cell integrity was higher by 20%.

AFPs are applied for storing food products as well. Thus, the adding into ice-cream of the AFPs-containing cold-acclimated wheat extracts enabled achieving more homogenous consistence of ice-cream, which underwent heating during storage [37]. This additive is capable to reduce the recrystallisation level by more than 40%. When adding 15.4% AFP *D. carota* a frozen dough has more uniform texture due to a decrease in it of water amount, freezing during storage [54]. The resulting dough is getting softer with stable volume of baked products. Adding AFP was established as not affecting the flavor and taste.

Thus, nowadays the studying of biological antifreezes is expanding and deepening, since a lot of questions have to be clarified: a relationship between the structure and function, regulation of antifreezes' expression and their origin. An applied usage of biological antifreezes is a certain field for investigations.

## References

1. Amir G., Horowitz L., Rubinsky B. et al. Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III // *Cryobiology*.– 2004.– Vol. 48, N3.– P. 273–282.
2. Baardsnes J., Davies P.L. Sialic acid synthase: the origin of fish type III antifreeze protein? // *Trends Biochem. Sci.*– 2001.– Vol. 26, N8.– P. 468–469.
3. Baguisi A., Arav A., Crosby T.F. et al. Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: development in vitro and in vivo // *Theriogenology*.– 1997.– Vol. 48, N6.– P. 1017–1024.
4. Barrett J. Thermal hysteresis proteins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*– 2001.– Vol. 33, Issue 2.– P. 105–117.
5. Buckland P.C. The early dispersal on insect pests of stored products as indicated by archaeological records // *J. Stored Prod. Res.*– 1981.– Vol. 17, N1.– P. 1–12.
6. Chakrabarty A., Yang D.S., Hew C.L. Structure-function relationship in a winter flounder antifreeze polypeptide. II. Alteration of the component growth rates of ice by synthetic antifreeze polypeptides // *J. Biol. Chem.*– 1989.– Vol. 264, N19.– P. 11313–11316.
7. Chen L., DeVries A.L., Cheng C.H. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1997.– Vol. 94, N8.– P. 3811–3816.
8. Chen L., DeVries A.L., Cheng C.H. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1997. – Vol. 94, N8.– P. 3817–3822.
9. Cziko P.A., Evans C.W., Cheng C.H. et al. Freezing resistance of antifreeze-deficient larval Antarctic fish // *J. Exp. Biol.*– 2006.– Vol. 209, Pt. 3.– P. 407–420.



## Литература

1. Amir G., Horowitz L., Rubinsky B. et al. Subzero nonfreezing cryopreservation of rat hearts using antifreeze protein I and antifreeze protein III // *Cryobiology*.— 2004.— Vol. 48, N3.— P. 273–282.
2. Baardsnes J., Davies P.L. Sialic acid synthase: the origin of fish type III antifreeze protein? // *Trends Biochem. Sci.*— 2001.— Vol. 26, N8.— P. 468–469.
3. Baguisi A., Arav A., Crosby T.F. et al. Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: development in vitro and in vivo // *Theriogenology*.— 1997.— Vol. 48, N6.— P. 1017–1024.
4. Barrett J. Thermal hysteresis proteins // *Int. J. Biochem. Cell Biol.*— 2001.— Vol. 33, Issue 2.— P. 105–117.
5. Buckland P.C. The early dispersal on insect pests of stored products as indicated by archaeological records // *J. Stored Prod. Res.*— 1981.— Vol. 17, N1.— P. 1–12.
6. Chakrabarty A., Yang D.S., Hew C.L. Structure-function relationship in a winter flounder antifreeze polypeptide. II. Alteration of the component growth rates of ice by synthetic antifreeze polypeptides // *J. Biol. Chem.*— 1989.— Vol. 264, N19.— P. 11313–11316.
7. Chen L., DeVries A.L., Cheng C.H. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1997.— Vol. 94, N8.— P. 3811–3816.
8. Chen L., DeVries A.L., Cheng C.H. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.— 1997.— Vol. 94, N8.— P. 3817–3822.
9. Cziko P.A., Evans C.W., Cheng C.H. et al. Freezing resistance of antifreeze-deficient larval Antarctic fish // *J. Exp. Biol.*— 2006.— Vol. 209, Pt. 3.— P. 407–420.
10. Doucet D., Tyshenko M.G., Davies P.L. et al. A family of expressed antifreeze protein genes from the moth, *Choristoneura fumiferana* // *Eur. J. Biochem.*— 2002.— Vol. 269, N1.— P. 38–46.
11. Duman J.G. Environmental effects on antifreeze levels in larvae of the darkling beetle, *Meracanta contracta* // *J. Exp. Zool.*— 1977.— Vol. 201, N4.— P. 333–337.
12. Duman J.G. Factors involved in the overwintering survival of the freeze-tolerant beetle *Dendroides canadensis* // *J. Comp. Physiol.*— 1980.— Vol. 136, N1.— P. 53–59.
13. Eniade A., Murphy A.V., Landreau G. et al. A general synthesis of structurally diverse building blocks for preparing analogues of C-linked antifreeze glycoproteins // *Bioconjug. Chem.*— 2001.— Vol. 12, N5.— P. 817–823.
14. Evans R.P., Fletcher G.L. Type I antifreeze proteins: possible origins from chorion and keratin genes in Atlantic snailfish // *J. Mol. Evol.*— 2005.— Vol. 61, N4.— P. 417–424.
15. Ewart K.V., Li Z., Yang D.S. et al. The ice-binding site of Atlantic herring antifreeze protein corresponds to the carbohydrate-binding site of C-type lectins // *Biochemistry*.— 1998.— Vol. 37, N12.— P. 4080–4085.
16. Graham L.A., Davies P.L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas // *Science*.— 2005.— Vol. 310, N5747.— P. 461.
17. Graham L.A., Walker V.K., Davies P.L. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* // *Eur. J. Biochem.*— 2000.— Vol. 267, N21.— P. 6452–6458.
18. 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.
19. Horwath K.L., Duman J.G. Involvement of the circadian system in photoperiodic regulation of insect antifreeze proteins // *J. Exp. Zool.*— 1982.— Vol. 219, N3.— P. 267–270.
20. Horwath K.L., Duman J.G. Induction of antifreeze protein production by juvenile hormone in larvae of the beetle *Dendroides canadensis* // *J. Comp. Physiol.*— 1983.— Vol. 151, N2.— P. 233–240.
21. 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.
22. Huang T., Nicodemus J., Zarka D.G. et al. Expression of an insect (*Dendroides canadensis*) antifreeze protein in *Arabidopsis thaliana* results in a decrease in plant freezing temperature // *Plant Mol. Biol.*— 2002.— Vol. 50, N3.— P. 333–344.
23. Jin Y., DeVries A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*— 2006.— Vol. 144, N3.— P. 290–300.
24. 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.
25. Kenward K.D., Altschuler M., Hilderbrand D. et al. Accumulation of type 1 fish antifreeze protein in transgenic tobacco is cold-specific // *Plant Mol. Biol.*— 1993.— Vol. 23, N2.— P. 377–385.
26. Li X.M., Hew C.L. Structure and function of an antifreeze polypeptide from ocean pout, *Macrozoarces americanus*: role of glutamic acid residues in protein stability and antifreeze activity by site-directed mutagenesis // *Protein Eng.*— 1991.— Vol. 4, N8.— P. 1003–1008.
27. Liu Y., Li Z., Lin Q. et al. Structure and evolutionary origin of Ca<sup>2+</sup>-dependent herring type II antifreeze protein // *PLoS ONE*.— 2007.— Vol. 2, N6.— P. e548.
28. Liu S., Wang W., Moos E. et al. In vitro studies of antifreeze glycoprotein (AFGP) and a C-linked AFGP analogue // *Biomacromolecules*.— 2007.— Vol. 8, N5.— P. 1456–1462.
29. 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.





40. Shneppenheim R., Theede H. Isolation and characterization of freezing point depressing peptides from larvae of *Tenebrio molitor* // Comp. Biochem. Physiol.— 1980.— Vol. 67B, N6.— P. 561–568.
41. Simpson D.J., Smallwood M., Twigg S. et al. Purification and characterisation of an antifreeze protein from *Forsythia suspensa* (L.) // Cryobiology.— 2005.— Vol. 51, N2.— P. 230–234.
42. 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.
43. Tomczak M.M., Hinch D.K., Estrada S.D. et al. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein // Biophys. J.— 2002.— Vol. 82, N2.— P. 874–881.
44. 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.
45. Wallis J.G., Wang H., Guerra D.J. Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures // Plant. Mol. Biol.— 1997.— Vol. 35, N3.— P. 323–330.
46. Wang J.H. A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during low-temperature preservation // Cryobiology.— 2000.— Vol. 41, N1.— P. 1–9.
47. Wang J.H., Bian H.W., Zhang Y.X. et al. The dual effect of antifreeze protein on cryopreservation of rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic suspension cells // Cryo Letters.— 2001.— Vol. 22, N3.— P. 175–182.
48. 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.
49. Wang R., Zhang P., Gong Z. et al. Expression of the antifreeze protein gene in transgenic gold fish (*Carassius auratus*) and its implication in cold adaptation // Mol. Mar. Biol. Biotechnol.— 1995.— Vol. 4, N1.— P. 20–26.
50. Wu Y., Fletcher G.L. Efficacy of antifreeze protein types in protecting liposome membrane integrity depends on phospholipid class // Biochim. Biophys. Acta.— 2001.— Vol. 1524, N1.— P. 11–16.
51. 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.
52. Yu J., Cheng C.H., DeVries A.L. et al. Characterization of a multimer type III antifreeze protein gene from the Antarctic eel pout (*Lycodichthys dearborni*) // Yi Chuan Xue Bao.— 2005.— Vol. 32, N8.— P. 789–794.
53. Zhang S., Wei Y., Pan H. Transgenic rice plants expressing a novel antifreeze glycopeptide possess resistance to cold and disease // Z. Naturforsch. C.— 2007.— Vol. 62, N 7-8.— P. 583–591.
54. Zhang C., Zhang H., Wang L. et al. Improvement of texture properties and flavor of frozen dough by carrot (*Daucus carota*) antifreeze protein supplementation // J. Agric. Food Chem.— 2007.— Vol. 55, N23.— P. 9620–9626.

Accepted in 16.09.2008

Поступила 16.09.2008