

УДК 577.112.853:57.017.3:575.852'112

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА И ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ АНТИФРИЗНЫХ БЕЛКОВ

© 2012 г. Л.Л. Бильданова, Е.А. Салина, В.К. Шумный

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: larisab@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 26 декабря 2011 г. Принята к публикации 1 февраля 2012 г.

Антифризные белки представляют собой класс белков, синтезируемых пойкилотермными организмами при холодовом стрессе. Эти белки имеют разное эволюционное происхождение, отличаются по первичной и вторичной структуре, механизму регуляции, однако все они имеют общее качество – способность адсорбироваться на поверхность кристаллов льда и модифицировать их рост. В обзоре с акцентом на злаковые растения, в том числе пшеницу, обобщены данные о происхождении антифризных белков, их таксономическом распространении, свойствах и особенностях функционирования.

Ключевые слова: антифризные белки (АФП), термогистерезис, ингибирование рекристаллизации льда, холодовая акклимация, закаливание, морозоустойчивость, злаки, пшеница.

Антифризные белки (АФП), или антифризные гликопротеины (АФГП), являются важными элементами низкотемпературной адаптации (Ewart *et al.*, 1999; Griffith, Yaish, 2004; Трунова, 2007). Действующая концентрация АФП в 300–500 раз ниже, чем других антифризных веществ (Zachariassen, Kristiansen, 2000). Способность находиться в свободном состоянии в водных растворах, а затем необратимо связываться с водой в ее твердом состоянии является определяющим физическим свойством АФП (Jia, Davies, 2002). Адсорбция АФП на поверхности льда приводит к разнице между температурой замерзания и температурой плавления, или термогистерезису (ТН), а также торможению рекристаллизации льда (IRI, ice recrystallization inhibition) (Knight *et al.*, 1984). Термогистерезисная, или антифризная, активность АФП – способность понижать температуру замерзания раствора без существенного влияния на температуру плавления. IRI-активность АФП позволяет уменьшить механическое повреждение тканей, препятствуя рекристаллизации – термодинамически обусловленному процессу непрерывного роста крупных кристаллов льда за счет более

мелких в процессе замораживания. Некоторые авторы считают некорректным употребление термина «антифризные» в ситуации, когда возможно образование льда, и предлагают другие названия: «связывающиеся со льдом белки» (ice-binding proteins – IBPs) (Janech *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011), «лед-активные белки» (IAPs, ice-active proteins) (Wharton *et al.*, 2005). Встречаются предложения изменить название для более точного отражения основной функции изучаемых протеинов. Например, «белки термогистерезиса» (THP – thermohisteresis protein) (Ewart *et al.*, 1999; Barrett, 2001) или «белки ингибиторы рекристаллизации льда» (IRIP) (Knight *et al.*, 1995).

Первые АФП описаны более 40 лет назад (DeVries, Wohlschlag, 1969). С тех пор выявлено множество их типов у представителей разных таксонов (табл. 1) (Jia, Davies, 2002). Судя по вариативности связывающихся со льдом белков и их неупорядоченному филогенетическому распространению, эти белки возникали независимо, в основном как инструмент приспособления вида к новой экологической нише или в связи с изменениями климата (Cheng, 1998; Doucet *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2010).

Биологическое значение АФП

Наиболее изучены АФП рыб полярных и приполярных регионов, описаны пять типов АФП рыб – типы I–IV и АФГП (табл. 1) (Jia, Davies, 2002; Harding *et al.*, 2003). В крови рыб концентрация АФП достигает 10–40 мг/мл (Graham *et al.*, 2008b). АФП идентифицированы у различных членистоногих: пауков, клещей, коллембол и у более чем 50 видов насекомых (Duman *et al.*, 2004; Graham, Davies, 2005). Об антифризной активности у растений впервые было сообщено в работе М. Urrutia с соавт. (1992), и с тех пор АФП были найдены у многих зимующих видов сосудистых растений, в том числе у папоротников, голосеменных, однодольных и двудольных покрытосеменных (Urrutia *et al.*, 1992; Duman, Olsen, 1993; Doucet *et al.*, 2000; Jarzabek *et al.*, 2009). АФП также обнаружены у бактерий (Raymond *et al.*, 2007), водорослей (Raymond, Knight, 2003), грибов (Xiao *et al.*, 2010) и нематод (Wharton *et al.*, 2005). ТН-активность варьирует от 0,1–0,6 °C у растений (Urrutia *et al.*, 1992; Worrall *et al.*, 1998) до 5–7 °C в гемолимфе многих зимующих жуков (Duman *et al.*, 2004). Основные характеристики АФП суммированы в табл. 1.

Виды, способные к накоплению АФП, можно разделить на две группы: избегающие замерзания (freeze avoidant) и морозоустойчивые (freeze tolerant). Избегающие замерзания виды могут предотвращать замерзание жидкостей организма в целом и способны к значительному переохлаждению, т. е. температура жидкостей в их организме ниже температуры замерзания. АФП препятствуют замораживанию, спровоцированному внешним льдом, и стабилизируют переохлажденное состояние путем инактивации нуклеаторов льда (DeVries, 1986; Zachariassen, Kristiansen, 2000). Зимующий жук *Rhagium inquisitor* избегает замерзания, накапливая антифризные агенты во внутриклеточной жидкости, кишечной жидкости и гемолимфе (Kristiansen *et al.*, 1999).

Морозоустойчивые виды выживают при образовании льда в организме, при этом центры образования льда локализованы в межклеточных, внеорганных областях или полостях организма. Общеизвестно, что образование внутриклеточного льда смертельно для лю-

бого организма (Самыгин, 1997). Единственным исключением является антарктическая нематода *Panagrolaimus davidi*, которая при резком снижении температуры демонстрирует предохранительное, превентивное (inoculative), замерзание, в результате которого становится более морозоустойчивой и выживает при внутриклеточном образовании льда (Wharton *et al.*, 2005).

Антифризная активность наблюдается в разных частях зимующих растений, включая семена, стебли, узлы кущения, кору, ветки, почки, черешки, пластинки листьев, цветы, ягоды, корни, корневища и клубни (Urrutia *et al.*, 1992; Duman, Olsen, 1993; Doucet *et al.*, 2000). Многим растениям для развития морозоустойчивости необходимо пройти период холодовой акклимации, или закалывания (Трунова, 2007). У озимой ржи при холодовой акклимации АФП накапливаются в апопласте листьев и узле кущения. Методом иммулокализации показано, что АФП связаны с эпидермисом и мезофильными клетками, окружающими межклеточное пространство (Antikainen *et al.*, 1996). Эта локализация соответствует известным местам формирования льда на поверхности листьев и межклеточном пространстве мезофилла и подтверждает, что АФП могут предотвращать замерзание клеток вследствие контакта с внешним льдом (Antikainen *et al.*, 1996). У персика был выявлен белок из группы дегидринов растений, имеющий антифризную активность, он оказался распределен по всей цитоплазме, пластидам и ядрам клеток ксилемы и клеток паренхимы коры (Wisniewski *et al.*, 1999).

При наличии нуклеаторов льда АФП снижают температуру замерзания листьев закаленной ржи примерно на 1 °C. Исследования *in vitro* показали, что апопластные белки, извлеченные из листьев закаленной озимой ржи, тормозят рекристаллизацию льда, а также замедляют темпы миграции льда через насыщенную раствором фильтровальную бумагу. Роль АФП растений, таким образом, состоит в том, чтобы непосредственно взаимодействовать со льдом и уменьшить повреждения, замедляя рост и рекристаллизацию льда (Moffatt *et al.*, 2006). Во время низкотемпературной акклимации накопление АФП коррелирует с повышенным уровнем морозостойкости у озимых и яровых

Таблица 1

Характеристика АФП

Вид	Мв, кДа	ТН, °С	Особенности структуры	Литературный источник
Костистые рыбы				
АГФП нототеноидные рыбы (<i>Notothenia coriiceps neglecta</i> , <i>Dissostichus mawsoni</i> , <i>Pagothe- nia borchgrevinki</i>), тресковые	2,6– 33	1,2	(Ala-Ala-Thr) _n ; n = 4–50; линейный белок/левозакрученная тройная спираль; дисахарид (b-D-галакто- зил-(1-3)-a-N-ацетил-D-галактоза- мин) связан с остатком Thr	Hsiao <i>et al.</i> , 1990; Harding <i>et al.</i> , 2003
I тип АФП керчак <i>Myoxocephalus scorpius</i> , зимняя камбала <i>Pseudopleuronectes americanus</i> , губан <i>Tautoglabrus adspersus</i>	3,3– 4,5	0,04– 0,67	обогащенный Ala-повтор из 11 а.о.; α-спираль	Harding <i>et al.</i> , 1999; Wierzbicki <i>et al.</i> , 2008; Hobbs <i>et al.</i> , 2011
II тип АФП морской ворон <i>Hermitripteris americanus</i> , атлантическая сельдь <i>Clupea harengus</i> , американская корюшка <i>Osmerus mordax</i>	11– 24	0,13	обогащенный Cys белок с дисуль- фидными связями; лектиноподоб- ный; Ca ²⁺ -зависимый и Ca ²⁺ -неза- висимый, глобулярный с участками α-спиралей и β-листов, образует димеры, может содержать олигоса- хариды	Wierzbicki <i>et al.</i> , 1997
III тип АФП бельдюги <i>Macrozoarces ame- ricanus</i> , <i>Rhizophila dearborni</i> ; зубатки <i>Anarhichas</i> sp.	6,5 7, 14	0,53	компактный глобулярный с корот- кими участками β-листов	Miura <i>et al.</i> , 1999; Baardsnes <i>et al.</i> , 2003
IV тип АФП <i>Myoxocephalus octodecimspon- sis</i> , <i>Pleuragramma antarcticum</i> , <i>Notothenia coriiceps</i>	12,3	0,08– 0,5	17 % Glu; пучок из 4 антипарал- лельных α-спиралей; гомологичен аполипопротеину	Davies, Sykes, 1997; Lee <i>et al.</i> , 2011
Гиперактивный АФП зимней камбалы <i>Pleuronectes</i> sp.	16,7	2,2	60 % Ala; α-спираль; образует ди- меры	Marshall <i>et al.</i> , 2005; Gauthier <i>et al.</i> , 2005
Членистоногие				
Рагий ребристый <i>Rhagium inquisitor</i>	12,8	7,7	6 рассеянных повторов 13 а.о., мотив Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr в центральной части повтора; 1 дисульфидный мостик	Kristiansen <i>et al.</i> , 1999, 2011; Zachariassen <i>et al.</i> , 2002
Чернотелка узкая <i>Anatolica polita</i>	30	0,45	обогащен Cys; повтор Thr–Cys–Thr; β-спираль	Mao <i>et al.</i> , 2011
Большой мучной хрущак <i>Tenebrio molitor</i>	8,5	2,5– 5,5	обогащен Tre, Cys; правозакручен- ная β-спираль на основе повторов из 12 а.о.; много цистеиновых мос- тиков	Graham <i>et al.</i> , 1997; Liou <i>et al.</i> , 1999
<i>Dendroides canadensis</i>	7,3– 16,2	5–6 (8–9)	повтор Thr–Cys–Thr; правозакру- ченная β-спираль на основе повто- ров по 12 и 13 а.о.; много цистеи- новых мостиков	Duman <i>et al.</i> , 2002
Почкоед еловый <i>Choristoneura fumiferana</i>	9, 12		левозакрученная β-спираль; повтор 15 а.о. (Thr–X–Thr); β-спирали име- ют поперечные секции и формируют параллельные β-слои	Graether <i>et al.</i> , 2000, 2003; Qin <i>et al.</i> , 2007

Окончание таблицы 1

Вид	Мв, кДа	ТН, °С	Особенности структуры	Литературный источник
Пяденица <i>Campaea perlata</i>	3,5; 8,3	6,4	обогащен Thr и Ala; β -спираль	Lin <i>et al.</i> , 2011
Снежная блоха (коллембола) <i>Hypogastrura harveyi</i> ; <i>Gressittacantha terranova</i>	6,5 15,7	4	45 % Gly; трипептидные повторы Gly – x_1-x_2 , (x_1 – G, x_2 – Ala или Val); 2 дисульфидных мостика, 6 полипролиновых спиралей II типа в антипараллельной ориентации	Graham, Davies, 2005; Mok <i>et al.</i> , 2010; Hawes <i>et al.</i> , 2011
Круглые черви				
Антарктическая нематода <i>Panagrolaimus davidi</i>	15	0,03	–	Wharton <i>et al.</i> , 2005
Растения				
Морковь <i>Daucus carota</i>	36	0,35	74 % Leu-богатых повторов (LLR); гликозилирован	Zhang <i>et al.</i> , 2004
Райграс пастбищный <i>Lolium perenne</i>	13,5 29	0,1	β -спираль; LLR повторы; гликозилирован	Griffith, Yaish, 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2010
Мягкая пшеница <i>Triticum aestivum</i>	26,8, 40,7	–	2 или 8 LLR повтора	Tremblay <i>et al.</i> , 2005
Рожь посевная <i>Secale cereale</i>	16–35	0,3	белки устойчивости к патогенам с ферментативной активностью	Hon <i>et al.</i> , 1995
Луговик антарктический <i>Deschampsia antarctica</i>	22	–	1–9 LRR и 16 'IRIP' повторов	John <i>et al.</i> , 2009
Паслен сладко-горький <i>Solanum dulcamara</i>	67	0,4	24 % Gly; на С-конце 10 повторов из 13 а.о.; гликозилирован	Urrutia <i>et al.</i> , 1992; Duman, 1994
<i>S. dulcamara</i>	47, 29	0,4	хитиназоподобный	Duman, 1994
<i>Ammopiptanthus mongolicus</i>	50	0,35	гликозилирован	Fei <i>et al.</i> , 2008
Ели <i>Picea abies</i> , <i>P. pungens</i>	27–30	2	хитиназоподобные	Jarżabek <i>et al.</i> , 2009
Диатомовые водоросли	24	2,5	–	Raymond, Knight, 2003; Bayer-Giraldi <i>et al.</i> , 2011
Грибы				
<i>Antarctomyces psychrotrophicus</i>	28	0,42	обогащен Thr; гликозилирован	Xiao <i>et al.</i> , 2010
Снежная плесень <i>Typhula ishikariensis</i> , <i>Coprinus psychromorbidus</i>	23	0,3– 2?*	–	
Дрожжи <i>Leucosporidium</i>	26,8	0,7	–	Lee <i>et al.</i> , 2010
Бактерии				
<i>Marinomonas primoryensis</i>	1000	2	тандемный повтор 104 а.о.; повтор из 19 а.о.; β -спиральные участки; Ca ²⁺ -зависимый	Gilbert <i>et al.</i> , 2005
<i>Colwellia</i>	26	< 0,1	первичная структура гомологична аналогичным белкам из снежной плесени и диатомовых водорослей	Raymond <i>et al.</i> , 2007

* Данные в разных источниках отличаются; прочерк – нет данных, Мв – молекулярный вес; ТН – величина термостерезиса; а.о. – аминокислотные остатки.

сортов ржи, пшеницы и ячменя (Antikainen, Griffith, 1997; Tremblay *et al.*, 2005).

Отметим, что выделенные из закаленных листьев ржи АФП относятся к трем классам белков устойчивости к патогенам (pathogenesis-related – PR): хитиназам (chitinase-like proteins – CLP), β -1,3-глюканазам (GLP) и тауматинам (TLP) (Hon *et al.*, 1995). Часть этих АФП имеет как антифризную, так и ферментативную активности (Hon *et al.*, 1995; Yaish *et al.*, 2006). Таким образом, АФП озимой ржи играют роль в морозоустойчивости и неспецифической устойчивости к болезням (Griffith, Yaish, 2004).

АФП найдены и у теплолюбивых организмов, в этом случае АФП уменьшают активность случайных и трудно устранимых нуклеаторов льда при внезапном уменьшении температуры окружающей среды (Parody-Morreale *et al.*, 1988). Кроме того, АФП играют криопротекторную роль в отношении некоторых мембран, предотвращая фазовый переход липидов и стабилизируя кальциевые каналы (Barrett, 2001).

АФП работают в сочетании с белковыми нуклеаторами льда, что позволяет организму контролировать скорость роста льда в процессе замораживания (Zachariassen, Kristiansen, 2000). Интересно, что у ризобактерии *Pseudomonas putida*, распространенной в арктических районах Канады, обнаружен АФП (164 кДа), связанный с углеводным и липидным фрагментами, который имеет и антифризную, и нуклеирующую активности (Moffatt *et al.*, 2006).

Свойства АФП предотвращать нуклеацию льда, тормозить рост кристаллов льда, ингибировать рекристаллизацию и защищать клеточные мембраны от повреждений (Kristiansen, Zachariassen, 2005; Pertaya *et al.*, 2008) могут быть использованы при хранении продуктов питания, в сельскохозяйственном производстве и для криоконсервации клеток и органов в медицине (Zhang *et al.*, 2007). Показано, что при замерзании и оттаивании в присутствии АФП рыб клетки млекопитающих, такие, как ооциты крупного рогатого скота, тромбоциты человека, эмбрионы мыши, сперматозоиды барана и клетки печени крыс, демонстрируют повышение уровня выживаемости и восстановления нормального функционирования (Fletcher *et al.*, 1999). Ведутся работы по синтезу модифицированных АФП с оптимизированной для конкретных условий

структурой (Tam *et al.*, 2009), трансформации растений и животных чужеродными генами АФП для повышения их устойчивости к низким температурам (Griffith, Yaish, 2004).

Таким образом, АФП выявлены у видов с разной стратегией выживания при понижении температуры окружающей среды. АФП накапливаются в местах наиболее вероятного образования льда, направляют и тормозят рост массивов льда внутри организма. Кроме того, АФП могут иметь дополнительные функции, способствующие выживанию при нехватке влаги или воздействии патогенов.

Механизм действия

В отличие от большинства растворимых веществ, которые вытесняются фронтом льда в процессе замораживания, АФП необратимо связываются с поверхностью льда и включаются в состав кристаллической решетки льда (DeVries, 1986). Связывание со льдом стабилизируется сочетанием ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей, возникающих за счет стратегически расположенных в соответствии с шагом решетки льда аминокислотных остатков (Jia, Davies, 2002). АФП специфически адсорбируются на определенные грани кристаллов льда (рис.) и поверхности малых льдоподобных кластеров молекул воды (зародышевых кристаллов или ядер), сформированных нуклеаторами льда (Graether, Sykes, 2004).

Антифризная активность фиксируется при микроскопировании водных растворов АФП по изменению морфологии кристаллов льда в процессе их роста (рис.) (Knight *et al.*, 1991) и при измерении нелинейного уменьшения температуры замерзания растворов (Kristiansen, Zachariassen, 2005). Форма кристаллов зависит от концентрации АФП и специфической активности конкретных изоформ (Meyer *et al.*, 1999). Для определения граней кристалла льда, с которыми связываются АФП, используют выращивание ледяной полусферы из единственного кристалла льда в растворе АФП низкой концентрации. Места адсорбции АФП видны невооруженным глазом как участки матовой поверхности на прозрачной ледяной полусфере (Knight, DeVries, 2009). Этим методом показано, что АФП I типа зимней камбалы связываются с

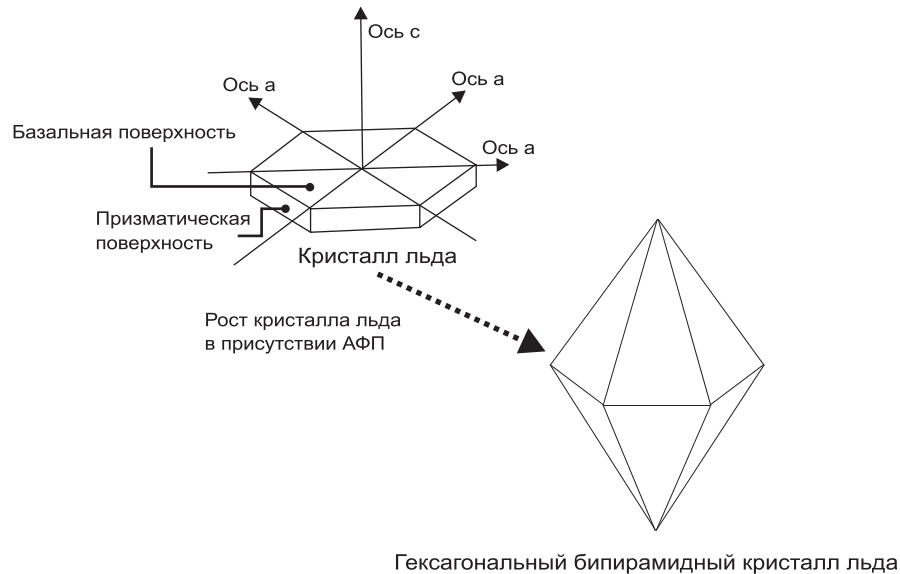


Рис. Схематическое изображение роста кристалла льда в растворе АФП.

12 гранями бипирамидального кристалла, тогда как АФП I типа керчаков связываются только с 6 гранями (Harding *et al.*, 1999).

Характер взаимодействия белка или углеводов со льдом во многом остается в области предположений (Garnham *et al.*, 2011), хотя были получены доказательства в пользу механизма адсорбционного ингибирования (Knight *et al.*, 1991; Pertaya *et al.*, 2007). Анализ АФП рыб, насекомых и растений показал, что, несмотря на сходство отдельных элементов, нет никакой консенсусной последовательности или единой структуры для льдосвязывающих доменов (Jia, Davies, 2002) (табл. 2), и что некоторые АФП меняют конформацию при низких температурах (Uda *et al.*, 2007). Поэтому не представляется возможным по структурным особенностям белков выявить новые АФП в базах данных; единственный способ обнаружить АФП – проанализировать способность белка связываться со льдом.

Эксперименты по замещению различных остатков в последовательностях АФП I типа рыб и АФП насекомых убедительно доказали, что гидрофобные взаимодействия, обеспечиваемые метильной группой остатков Thr, имеют решающее значение для связывания этих АФП со льдом (Baardsnes *et al.*, 1999; Leinala *et al.*, 2002a; Wierzbicki *et al.*, 2008). Однако в случае АФГП показано, что гидрофильные взаимодействия являются необходимым условием адсорбции на решетку льда (Knight *et al.*, 1991;

Tam *et al.*, 2009). В последнее время была изучена гидратация АФГП и продемонстрирована ее роль в механизме действия АФП/АФГП (Ebbinghaus *et al.*, 2010).

В отличие от АФП рыб и насекомых целый ряд АФП растений имеет множественные гидрофильные сайты связывания со льдом (Griffith, Yaish, 2004; John *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2011). Например, АФП пшеницы имеют 2 сайта связывания со льдом, комплементарных призматической поверхности льда и расположенных напротив друг друга (Tremblay *et al.*, 2005).

Поиск общего механизма связывания АФП со льдом осложнен вариабельностью структуры этих белков и тем, что они распознают различные по структуре поверхности кристалла льда. Тем не менее некоторые общие свойства и закономерности были выявлены. Сайты связывания со льдом, как правило, плоские, относительно гидрофобные и занимают большую часть поверхности белка (Davies *et al.*, 2002). Для создания более четкого представления необходимо охарактеризовать большее количество АФП.

Свойства АФП и влияние различных факторов на их проявление

Разные виды активности, ТН и IRI, проявляются у конкретных АФП в разной степени, взаимосвязь между ТН- и IRI-активностями остается предметом изучения (Yu *et al.*, 2010). Не-

Таблица 2

Число генов, возможные эволюционные предшественники,
особенности сайтов связывания со льдом АФП рыб, насекомых и растений

Белок	Количество генов	Гомологичные белки	Сайт связывания со льдом	Литературный источник
АГФП (тресковые, нототеноидные рыбы)	41*	трипсиногено-подобная протеаза	повторы Gal-GalNAc	Cheng, 1998
I тип АФП рыб (керчак, зимняя камбала)	80–100	белки хориона и кератина <i>Liparis atlanticus</i>	повторяющиеся консервативные Thr, Ala	Evans, Fletcher, 2005; Hobbs <i>et al.</i> , 2011; Zhang <i>et al.</i> , 2009
II тип АФП рыб (морской ворон, атлантическая сельдь, американская корюшка)	15	лектин С-типа животных	сайт связывания Ca ²⁺ , плоская гидрофобная поверхность	Nishimiya <i>et al.</i> , 2008
III тип АФП рыб (бельдюги, зубатки)	30–150	синтаза силовой кислоты (SAS)	β-спираль на С-конце	Deng <i>et al.</i> , 2010; Zhang <i>et al.</i> , 2009
IV тип АФП рыб (бычки)	небольшое семейство	аполипопротеин	–	Davies, Sykes, 1997
Гиперактивный АФП I типа рыб (зимняя камбала)	–	АФП I типа зимней камбалы	консервативные Thr, Ala в повторе	Marshall <i>et al.</i> , 2005
АФП моли (еловый почкоед <i>C. fumiferana</i> , пяденица <i>C. perlata</i>)	17	–	‘Thr-X-Thr’ мотив, β-спираль левозакрученная	Tyshenko <i>et al.</i> , 1997
АФП жуков (<i>D. canadensis</i> , <i>T. molitor</i>)	12; 30–50	–	‘Thr-X-Thr’ мотив, β-спираль правозакрученная	Graham <i>et al.</i> , 1997
АФП жуков (рагий ребристый)	семейство	–	6 Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr мотивов, β-спираль	Kristiansen <i>et al.</i> , 2005, 2011
АФП снежной блохи	2	–	широкая поверхность из β-спиралей	Mok <i>et al.</i> , 2010
Хитиназа-АФП (рожь посевная, мягкая пшеница, паслен сладко-горький)	небольшое семейство	эндохитиназы I и II класса	–	Hon <i>et al.</i> , 1995; Yeh <i>et al.</i> , 2000; Duman, 1994; Winfield <i>et al.</i> , 2010
Глюканаза-АФП (рожь посевная)	небольшое семейство	эндоглюконаза	не пересекается с гидролитическим сайтом	Hon <i>et al.</i> , 1995; Yaish <i>et al.</i> , 2006
Тауматин-АФП (рожь посевная)	небольшое семейство	тауматин	–	Hon <i>et al.</i> , 1995
IRIP злаков **	2–15	киназа рецептора фитосульфокина риса	β-спираль; два гидрофильных сайта	Tremblay <i>et al.</i> , 2005; Middleton <i>et al.</i> , 2009; John <i>et al.</i> , 2009
DcAFP (морковь)	1	ингибитор полигалактурназы	–	Smallwood <i>et al.</i> , 1999; Zhang <i>et al.</i> , 2004
STHP-64 (паслен сладко-горький)	1	WRKY (фактор транскрипции)	–	Huang, Duman, 2002

* Полипротеин из 41 копии гена; ** TaIRI (мягкая пшеница), LpAFP (райграсс пастбищный), DaIRIP (луговик антарктический).

которые мутантные АФП без ТН-активности, но имеющие ту же форму и размер, теряют и способность ингибировать рекристаллизацию, что говорит об общей значимой структуре для обеих функций (Knight *et al.*, 1995). Это подтверждает существование обратной зависимости между уровнем ТН и размером кристаллов льда, т. е. чем меньше размер кристаллов льда, тем больше ТН-эффект (Kristiansen *et al.*, 2005).

Некоторые АФП отличаются очень высокой ТН-активностью (4–6 °С) при субмиллимолярных концентрациях, их называют «гиперактивными» (Graham *et al.*, 1997). Гиперактивные АФП и умеренно активные АФП, кроме разницы в их ТН-активности, отличаются и по картине роста кристаллов льда после превышения порога ТН, когда поверхностно адсорбированные АФП уже не в состоянии предотвратить нарастание льда. Умеренно активные АФП направляют рост спикул льда вдоль с-оси кристалла льда, тогда как все гиперактивные АФП способствуют росту вдоль а-оси, приводя к появлению дендритных кристаллов (Scotter *et al.*, 2006). Кроме того, эксперименты по выращиванию макроскопических кристаллов льда показали, что более высокая активность гиперактивных АФП является результатом адсорбции как на призматические плоскости кристалла льда, так и на базальные (Scotter *et al.*, 2006; Mok *et al.*, 2010). Негиперактивные АФП не связываются с базальной плоскостью (Knight *et al.*, 1991; Pertaya *et al.*, 2008).

Не удалось выявить корреляцию между высокой ТН-активностью и высокой IRI-активностью, гиперактивные АФП и АФП со средней активностью имеют примерно одинаковую IRI-активность (Yu *et al.*, 2010). Важно отметить, что в экспериментах по направленному мутагенезу при значительном изменении связывающихся со льдом остатков в структуре АФП уменьшалась как ТН-, так и IRI-активность, показывая, что одни и те же аминокислотные остатки имеют решающее значение для обоих видов активности. Кроме того, ионы бикарбоната, повышающие ТН-активность АФП, также повышают IRI-активность. Предполагается, что гиперактивные и негиперактивные АФП отличаются по площади сайта связывания со льдом, а также по стабильности связи АФП и льда в условиях переохлаждения и рекристаллизации (Yu *et al.*, 2010).

Исследования показали зависимость уровня ТН-активности от ряда факторов, которые включают как вариации структуры АФП, так и влияние различных веществ, к которым относятся низкомолекулярные соединения (Li *et al.*, 1998; Graether *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2007; Kristiansen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), различные белки (Nishimiya *et al.*, 2008), в том числе другие АФП (Amornwittawat *et al.*, 2008). Добавление солей приводит к повышению активности ТН в несколько раз (Evans *et al.*, 2007), возможно, это происходит за счет снижения растворимости белка (Kristiansen *et al.*, 2008). Отметим, что антифризная активность увеличивается в присутствии эндогенных низкомолекулярных полиолов, которые накапливаются у многих организмов при низкотемпературной адаптации (Li *et al.*, 1998).

Важный результат получен в эксперименте по переносу генов АФП жука *Dendroides canadensis* в геном *Drosophila melanogaster*. Выяснилось, что совместное введение двух генов приводило к большему ТН, чем введение одного из этих генов (Lin *et al.*, 2010). Эти данные согласуются с наблюдаемым у зимующей личинки *Dendroides canadensis* очень высоким значением ТН (3–5 °С) и присутствием в гемолимфе множества изоформ АФП, которые, очевидно, усиливают действие друг друга (Amornwittawat *et al.*, 2008).

Кроме того, в гемолимфе *Dendroides canadensis* обнаружено наличие тауматиноподобного белка-усилителя АФП и высокой концентрации глицерина (0,5–1,0 М). Глицерин повышает активность АФП путем стимуляции взаимодействия между разными изоформами, так как при его добавлении в раствор, содержащий одну изоформу, эффект отсутствовал (Wang, Duman, 2006). Наличие в организме усилителей АФП приводит к тому, что ТН-активность очищенного единичного DAFP ниже, чем ТН в гемолимфе (Amornwittawat *et al.*, 2008).

Наиболее эффективным низкомолекулярным усилителем является цитрат натрия. В присутствии цитрата натрия ТН-активность гемолимфы жука *Dendroides canadensis* увеличилась в 6 раз (Li *et al.*, 1998). Эксперименты показали, что концентрация низкомолекулярных усилителей, необходимая для повышения активности, составляет около 250–500 мМ (Amornwittawat

et al., 2008). Глицерин оказался единственным усилителем, который естественным образом присутствует в достаточно высоких концентрациях у *D. canadensis*.

Влияние увеличения сайта связывания со льдом на ТН-активность за счет олигомеризации показано при изучении естественных и синтезированных искусственных мультимеров АФП рыб III типа (Baardsnes *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Оказалось, что ТН возрастает пропорционально размеру мультимеров, при этом каждый мультимер придает кристаллу льда уникальную форму, представляющую собой измененный вариант изначальной бипирамиды (Zhang *et al.*, 2009). Аналогичное явление наблюдалось в растворах синтезированных аналогов малых АФГП рыб с концентрацией белка > 20 mM, в которых образуются димеры и наблюдаемая при этом ТН активность намного выше, чем в растворах с меньшими концентрациями, при которых не происходит агрегация белков. Этот факт свидетельствует о кооперативном характере функционирования низкомолекулярных АФГП. Взаимодействие наблюдается также между АФГП разных фракций (Bouvet *et al.*, 2006).

Интересно, что АФП с отличающимися лед-связывающими доменами могут образовывать олигомеры разного состава, что позволяет увеличивать вариабельность и число лед-связывающих доменов, как показано в случае АФП озимой ржи (*Secale cereale*) (Griffith, Yaish, 2004). Листья закаленной ржи содержат 6 апопластных полипептидов с различной комбинацией глюконазоподобных, хитиназоподобных и тауматиноподобных АФП в комплексе с другими неизвестными белками (Antikainen, Griffith, 1997). Формируя олигомерные комплексы, АФП могут образовывать более протяженные поверхности для взаимодействия со льдом, или они могут просто увеличить массу связанного со льдом белка. В любом случае комплексы АФП могут подавлять рост льда и перекристаллизацию более эффективно, чем отдельные полипептиды.

АФП часто представлены в организме несколькими изоформами, отличными по структуре, молекулярной массе, сродству к поверхностям кристалла льда и месту функционирования (DeVries, 1986; Knight *et al.*, 1991; Ewart *et al.*, 1999), кроме того, в геноме обнаруживаются множественные копии генов АФП (табл. 2). На-

пример, у зимней камбалы *Pseudopleuronectes americanus* есть два аналогичных семейства АФП генов. Гены одного из семейств экспрессируются в печени и кишечнике, при этом белки накапливаются в крови и кишечной жидкости, гены другого семейства функционируют в поверхностных тканях, таких, как кожа, чешуя, плавники и жабры (Gong *et al.*, 1996).

Многие семейства АФП включают изоформы с дополнительными повторами и повышенной активностью (Harding *et al.*, 1999). Впервые это было показано на примере АФГП рыб (Wu *et al.*, 2001). Треска *Gadus ogac*, например, синтезирует большое количество изоформ АФГП, и оценка термостерезисной активности различных изоформ показала, что АФГП с более низким молекулярным весом имеют меньшую активность, при этом аминокислотный состав не имел существенного значения (Harding *et al.*, 2003). Принимая во внимание предполагаемую линейную структуру АФГП, предполагают, что изоформы с более низкой молекулярной массой, скорее всего, короче. Таким образом, существует связь между длиной АФГП и активностью. Изоформа АФП I типа зимней камбалы с 4 тандемными 11-аминокислотными повторами в два раза более активна, чем изоформа с 3 повторами (Evans, Fletcher, 2005).

Изучение структуры больших изоформ позволяет объяснить это наблюдение: область предполагаемого сайта связывания льда в больших изоформах снежной блохи примерно в два раза больше, чем у меньших изоформ (Lin *et al.*, 2007), а большая изоформа АФП *Choristoneura fumiferana* имеет в три раза большую ТН-активность и 2 дополнительных витка внутри β -спирали, являющейся сайтом связывания со льдом (Leinälä *et al.*, 2002b). Показано, что большее число Thr-X-Thr-мотивов в сайте связывания льда у АФП насекомых увеличивает результирующую антифризную активность (Graether *et al.*, 2000; Leinälä *et al.*, 2002b; Marshall *et al.*, 2004; Kristiansen *et al.*, 2011).

Регуляция синтеза АФП

Для развития устойчивости к низкотемпературному стрессу требуется воздействие низкой положительной температуры, которая выше температуры замерзания, что позволяет

организму подготовиться к последующему воздействию летальных низких температур (Antikainen, Griffith, 1997). Во многих случаях АФП синтезируются сезонно или на определенной стадии развития организма, т. е. регулируются онтогенетически (Barrett, 2001).

Костистые рыбы. Различные виды рыб имеют особенности стратегии сезонного регулирования синтеза АФП (Fletcher *et al.*, 2001). Некоторые начинают синтез АФП перед наступлением холодов, другие – только в ответ на понижение температуры, в то время как отдельные виды могут синтезировать АФП постоянно.

В крови нототениевых рыб уровень антифризных гликопротеидов (АФГП) снижается при тепловой акклимации (4 °C) в течение 16 недель, но количество крупных компонентов АФГП уменьшается незначительно (на 20 %), в отличие от малых АФГП (на 60 %) (Jin, DeVries, 2006). А в крови бельдюги *Lycodichthys dearborni* высокий уровень белков семейства АФП III типа сохраняется на протяжении года (Wang *et al.*, 1995). На примере мальков нототениевых рыб показано, что далеко не все антарктические рыбы на ранних стадиях жизненного цикла обладают АФП (Cziko *et al.*, 2006; Bilyk, DeVries, 2011). По-видимому, мальки рыб, у которых АФП не обнаружены, используют другие механизмы защиты.

Синтез АФП у зимней камбалы регулируется сезонно гормонами гипофиза, и уровень мРНК АФП I типа в печени летом и зимой отличается в 1 тыс. раз (Duncker *et al.*, 1995). При гипофизэктомии уровень АФП в печени увеличивается только в 40 раз, а уровень АФП в других органах не меняется (Gong *et al.*, 1995). Рост уровня мРНК в осенний период модулируется гипофизом в ответ на уменьшение длины дня и весной падает в ответ на повышение температуры. Было высказано предположение о том, что это уменьшение может быть связано, по крайней мере, частично, со стабильностью мРНК при низких температурах (Duncker *et al.*, 1995). Также показано, что в коже и печени зимней камбалы гены АФП регулируются независимо, даже был охарактеризован специфический энхансерный В-элемент печени (Barrett *et al.*, 2001).

При содержании зубатки *Anarhichas lupus* в теплой воде и при сезонном изменении светового дня амплитуда сезонных циклов ак-

тивности АФП значительно уменьшалась, что свидетельствует о необходимости понижения температуры воды для достижения максимального уровня АФП в плазме крови. Тем не менее несмотря на пребывание рыбы в теплой воде, уровень активности АФП стал выше летнего в то же самое время года, когда рыбы подвержены сезонным изменениям температуры воды. Это говорит о том, что фотопериод играет важную роль в регулировании годового цикла АФП рыб (Desjardins *et al.*, 2006).

Насекомые. Окружающая среда является одним из факторов, которые влияют на производство белков или соединений, участвующих в морозоустойчивости насекомых. Например, у мухи *Eurosta solidaginis* быстрый рост концентрации криопротекторов, глицерина и сорбита происходит после первого осеннего мороза (Graham *et al.*, 2000). Транскрипты АФП выявляются у снежной блохи, собранной в конце весны в тающем снегу (Graham, Davies, 2005). Сезонные изменения активности ТН и уровней транскриптов АФП были замечены у личинок *Dendroides canadensis*, причем максимальный уровень транскрипции приходится на зимнее время и некоторые изоформы обнаруживаются в теплые месяцы (Andorfer, Duman, 2000). Предполагают, что летние изоформы, выявляемые у насекомых, служат для снижения активности потенциальных нуклеаторов льда в случае ранних морозов.

Насекомые, живущие в зоне умеренного климата, обычно зимуют на определенной стадии развития. Таким образом, внутренние процессы развития, в дополнение к сигналам окружающей среды, могут играть свою роль в приобретении морозоустойчивости. У *Tenebrio molitor*, *Dendroides canadensis* и *Choristoneura fumiferana* присутствие АФП коррелирует со стадией развития, однако существуют и другие способы регуляции как для каждого насекомого, так и для отдельных изоформ АФП внутри вида (Qin *et al.*, 2006; Doucet *et al.*, 2009). Интересно, что *Choristoneura fumiferana* синтезирует значительное количество другого криопротектора – глицерина – только после воздействия низких температур в середине диапаузы (Graham *et al.*, 2000).

Воздействие низкой температуры и засушливых условий в течение нескольких недель

приводит к увеличению уровня транскрипции АФП у личинок *Tenebrio molitor*, однако решающим фактором остается стадия развития (Graham *et al.*, 2000). Данные о влиянии короткого фотопериода на уровень АФП в гемолимфе *Tenebrio molitor* противоречивы: в отдельных работах показано увеличение TmAFP мРНК, в других такого влияния не обнаружили (Doucet *et al.*, 2009). Сохранение умеренного уровня АФП у куколок и взрослых насекомых *Tenebrio molitor* в отсутствие значимых уровней транскриптов подтверждает то, что белки являются стабильными и могут сохраняться в качестве защиты от низких температур. Куколки имеют небольшую холодостойкость, и так как личинки окукливаются весной, АФП обеспечивают защиту от поздних заморозков. В эксперименте любое внешнее воздействие, замедляющее рост личинок, вызывало увеличение ТН, поэтому авторы предположили, что прекращение развития личинок является первичным фактором регуляции синтеза АФП у *Tenebrio molitor* (Graham *et al.*, 2000).

Известно, что ювенильный гормон индуцирует диапаузу личинок. Возможно, что он участвует также и в инициации холодоустойчивости. Например, у *Dendroides canadensis* ювенильный гормон стимулирует продукцию АФП (Hogwath, Duman, 1983). Однако несмотря на обширные исследования, в прилегающих районах гена *TmAFP* не было найдено никаких участков ДНК, связанных с гормональной регуляцией АФП (Qin, Walker, 2006).

Растения. Исследования показали, что у растений экспрессия генов АФП происходит во время низкотемпературной акклимации, или закалывания (Urrutia *et al.*, 1992; Hon *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2000; Huang, Duman, 2002). Только у луговника антарктического *Deschampsia antarctica* была обнаружена IRI-активность в листьях неакклиматизированного растения (Bravo, Griffith, 2005), что, однако, не нашло подтверждения при использовании другого метода анализа (John *et al.*, 2009).

Условия, используемые для закалывания, имитируют осень, когда дни становятся короче и холоднее. Таким образом, низкие температуры и световой день являются важными сигналами окружающей среды для производства АФП. Например, растения озимой ржи, выращенные

при низких температурах, накапливают больше апопластного белка при 8-часовом дне, чем при 16-часовом (Marentes *et al.*, 1993). АФП паслена *Solanum dulcamara*, моркови *Daucus carota* и райграса *Lolium perenne* в естественных условиях накапливаются только после ноября (Smallwood *et al.*, 1999; Huang, Duman, 2002; Pudney *et al.*, 2003).

Чтобы определить, связана ли антифризная активность с морозоустойчивостью и является ли накопление антифризных белков при воздействии низких температур общим свойством растений, были изучены 12 однодольных и двудольных травянистых растений (Antikainen, Griffith, 1997). Значительный уровень антифризной активности выявлен в апопластных экстрактах только у закаленных злаков, причем только родственные злаки (пшеница, ячмень, рожь) накапливают АФП, сходные с белками устойчивости к патогенам. Оказалось, что у двудольных растений (табак, капуста, шпинат, рапс) морозоустойчивость не коррелирует с наличием антифризной активности в апопласте (Antikainen, Griffith, 1997).

Регулирование АФП является сложным процессом, поскольку оно имеет тканеспецифические особенности и зависит от стадии развития, о чем свидетельствуют исследования низкотемпературной индукции и тканевой специфичности АФП у моркови и ржи (Griffith, Yaish, 2004). Ген АФП моркови экспрессируется в течение 30 мин после воздействия на проростки температуры 4 °C и достигает стационарного уровня в течение 24 ч (Meyer *et al.*, 1999). Транскрипция гена поддерживается на стационарном уровне в листьях, стеблях и корнях взрослых растений моркови во время холодных и коротких дней, причем наибольшая экспрессия наблюдается в корнях, что объясняется двулетним циклом развития моркови, при котором сохранность корней является приоритетной, а надземные части растения отмирают (Smallwood *et al.*, 1999).

Было показано, что различные АФП озимой ржи накапливаются с разной скоростью: глюканазы появляются первыми, затем тауматинподобные АФП, последними синтезируются хитиназы-АФП (Hon *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2000).

В отличие от АФП моркови хитиназы-АФП озимой ржи не синтезируются непосредственно

в ответ на холод и/или короткие дни в листьях, выросших при высокой температуре и перенесенных в закаливающие условия. Хитиназы-АФП накапливаются только в тех листьях, которые выросли при пониженной температуре, т. е. экспрессия хитиназ-АФП индуцируется холодом на определенной стадии развития растения (Yeh *et al.*, 2000).

Предполагают, что PR-белки с антифризной активностью и без нее являются членами одного семейства родственных генов, которые дифференциально регулируются в ответ на холод и воздействие патогенов (Gozzo, 2003). Так, растения озимой ржи в нормальных условиях роста, инфицированные патогенами или обработанные салициловой или абсцизовой кислотами, хоть и накапливают PR-белки, похожие на те, которые синтезируются при низкотемпературной акклимации, однако у PR-белков из незакаленных растений отсутствует антифризная активность (Griffith, Yaish, 2004). Также глюканаза неакклимированной озимой ржи *Secale cereale* имеет чрезвычайно низкую антифризную активность по сравнению с глюканазами, синтезирующимися в холодоакклимированных растениях (Yaish *et al.*, 2006). Это говорит о том, что отдельные члены семейств PR-белков приобрели способность экспрессироваться при воздействии холода.

Озимая рожь синтезирует АФП при 20 °C в засушливых условиях или при воздействии этилена, тогда как обработка растений абсцизовой и салициловой кислотами или инфицирование патогенной розовой снежной плесенью (*Microdochium nivale*) не ведет к появлению АФП (Griffith, Yaish, 2004).

Транскрипт *TaIRI-1* у мягкой пшеницы начинает накапливаться после воздействия пониженной температуры (4 °C) и достигает своего максимального уровня после 36 дней акклимации. Дальнейшее воздействие низкой температуры не приводит к более высокому содержанию транскрипта. Транскрипт *TaIRI-2* также накапливается сразу после начала закаливания, но достигает максимального значения ранее во время периода акклимации. После деакклимации уровень транскриптов возвращается к таковому у неакклимированных растений контроля. Транскрипт *TaIRI-1* обнаружен в листьях, узле кущения и корнях, в то время как

транскрипт *TaIRI-1* — только в листьях. Транскриптов накапливается больше в зимостойких видах, таких, как пшеница, по сравнению с менее морозостойкими овсом и ячменем, и не обнаружено накопление в холодочувствительных видах, таких, как рис и кукуруза. Другие методы воздействия, такие, как солевой стресс, нехватка воды, экзогенные АВА, тепловой шок и механические повреждения не имеют заметного воздействия на накопление транскриптов *TaIRI*. Данные показывают, что биотические стрессы также не вызывают экспрессии *TaIRI*-генов. Однако фитогормоны, участвующие в механизме защиты от патогенов (жасмоновая кислота и этилен), индуцируют экспрессию одного из двух генов — *TaIRI-1* (Tremblay *et al.*, 2005).

В эксперименте по сравнительному изучению транскрипции у озимых и яровых сортов мягкой пшеницы в условиях низкотемпературного кратковременного стресса (холодового шока) и акклимации было показано, что транскрипты PR-АФП синтезируются только при длительном воздействии низкой температуры, а *TaIRI*-гены экспрессируются в обоих случаях (Winfield *et al.*, 2010). Причем гены *TaIRI* экспрессируются между 5-й и 9-й неделями акклимации, тогда как транскрипты PR-АФП появляются между 3-й и 5-й неделями воздействия. В работе отмечено, что несколько генов, *TaIRI*, *WLT10*, *BLT14-1*, *BLT14-2*, дигедрин, ксилотрансглюкозилаза и предсказанный трансмембранный белок, имеют одинаковый профиль экспрессии. Авторы предполагают, что эти гены регулируются совместно. Интересно, что при акклимации в листьях озимой пшеницы экспрессируется предполагаемый ген-ингибитор полигалактуроназы (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP), аналогичный гену АФП моркови (Worrall *et al.*, 1998).

Таким образом, у рыб, насекомых и растений гены АФП являются членами семейств родственных генов, при этом как семейства, так и отдельные гены внутри семейства могут отличаться по месту функционирования и по способу регулирования. В наибольшей степени на уровень АФП влияет изменение температуры и длины светового дня и в меньшей степени — другие факторы внешней среды. Также показано, что экспрессия многих генов АФП зависит

от стадии развития организма. Интересно отметить, что АФП растений могут иметь дополнительную функцию защиты от патогенов.

Происхождение и эволюция АФП

Группа АФП характеризуется недавним эволюционным происхождением, множественностью компонентов у одного организма, независимым происхождением у представителей близкородственных таксонов и конвергентным сходством у неродственных групп организмов (Barrett, 2001) (табл. 2).

Костистые рыбы. АФП антарктических нототениевых рыб произошел от функционально неродственной панкреатической трипсинагоподобной протеазы (Cheng, 1998). Важный промежуточный компонент этого эволюционного процесса – транскрипционно активный химерный ген, кодирующий как АФП полипротеин, так и протеазу, был обнаружен в геноме гигантского антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* (Cheng, Chen, 1999). Одновременное присутствие протеазного гена, несущего зарождающийся Thr-Ala-Ala-кодирующий элемент, транскрипционно активного химерного АФП-протеазного гена и независимых АФП генов подтверждает, что АФП-последовательность возникла как часть неродственного протеазного гена, подверглась экспансии и обрела независимость, потеряв большую часть протеазного домена (Cheng, Chen, 1999). Небольшая дивергенция последовательностей (4–7 %) между генами АФП и трипсинагоном нототениевых рыб говорит о том, что ген протеазы трансформировался в ген белка, связывающегося со льдом, относительно недавно – около 5–14 млн лет назад, что согласуется с оценками времени начала замерзания антарктических вод 10–14 млн лет назад и временем основной филетической дивергенции семейств нототениевых рыб 7–15 млн лет назад, по данным анализа последовательностей митохондриальной рДНК (Cheng, 1998).

Последовательность АФП арктической трески *Boreogadus saida* сравнили с АФП геном нототениевых рыб (Cheng, 1998). АФП гены *Boreogadus saida* имеют схожую с генами нототениевых рыб полипротеиновую структуру, в которой копии кодирующих АФП-

последовательностей разделены небольшими спейсерами. Однако гены АФП нототениевых и тресковых имеют отличия, которые убедительно показывают независимую эволюцию АФП-генов трески: а) различные сигнальные пептидные последовательности; б) разные последовательности спейсеров, соединяющих отдельные гены АФП в полипротеин, что приводит к различным механизмам процессинга предшественников полипротеина; в) разные последовательности, кодирующие повторы Thr-Ala/Pro-Ala; г) геномные локусы АФП гена трески и нототениевых АФП тоже отличаются (Cheng, 1998). Таким образом, почти идентичные АФП двух не связанных групп рыб представляют собой пример конвергенции белковых последовательностей, т. е. развитие аналогичного белка из разных предков в результате воздействия одинаковых условий окружающей среды.

АФП I типа рыб являются полифилетическими по происхождению, они обнаружены у представителей трех неродственных отрядов костистых рыб и представляют собой пример конвергентной эволюции (Hobbs *et al.*, 2011). Установлена гомология между геном АФП I типа рыб и генами белков хориона и кератина липариса *Liparis atlanticus*, которые экспрессируются в печени. Возможно, среди этих генов находятся предки АФП I, от которых в результате сдвига рамки считывания произошли гены белков с антифризной активностью (Evans, Fletcher, 2005).

Гиперактивные АФП I типа зимней камбалы в 10–100 раз более активны и имеют больший молекулярный вес, чем АФП I типа. Несмотря на это отличие, данные АФП, скорее всего, являются паралогичными, так как имеют участки значительной гомологии последовательностей ДНК (Gauthier *et al.*, 2005). Гиперактивная изоформа была выявлена у трех видов рода правогоглазых камбал, причем у одного из этих видов нет малых изоформ. Семейство генов АФП I типа состоит из 30–40 элементов, многие из которых являются tandemными повторами, и поскольку эти гены кодируют функционально важные белки, невозможно представить, что они элиминировались из генома или стали молчащими. Следовательно, можно предположить, что гиперактивная и малая изоформа имели

общего предшественника и в ходе эволюции ген малой изоформы подвергся амплификации (Gauthier *et al.*, 2005).

Филогенетический анализ показывает, что все АФП II (Ca^{2+} -зависимые и Ca^{2+} -независимые) произошли от общего предка и дивергировали, развивая различные механизмы связывания со льдом (Liu *et al.*, 2007). Возможно, связывающийся со льдом домен АФП II появился в ходе молекулярной эволюции сайта распознавания углеводов лектиноподобного предка (Ewart *et al.*, 1998).

Независимое появление АФП II типа в трех неродственных ветвях костистых рыб (сельди, корюшки и морского ворона) является экстраординарным по нескольким причинам (Graham *et al.*, 2008a). Эти гомологи лектинов являются единственными лектинами, у которых пятый дисульфидный мостик специфически локализован, и они гораздо более похожи друг на друга, чем на любой другой гомолог лектинов. Их сходство распространяется и на уровень последовательности ДНК, где даже интроны имеют до 97 % гомологии. В базах данных не были обнаружены родственные аминокислотные последовательности других видов с гомологией более 40 %. Это согласуется с данными геномной Саузерн-гибридизации, которая показала отсутствие гомологов АФП второго типа у других видов рыб. Консервативность интронов и экзонов, отсутствие корреляции между эволюционным расстоянием и скоростью мутаций, соотношение синонимичных и несинонимичных замен в кодонах не соответствуют гипотезе о существовании предшественника этих генов, который был элиминирован во всех таксонах костистых рыб.

Некоторые авторы считают, что горизонтальный перенос гена АФП II типа является наиболее вероятным объяснением большой гомологии аминокислотной последовательности (до 85 %), низкой частоты синонимичных мутаций и высокой консервативности числа, положения и последовательности интронов (Graham *et al.*, 2008a).

В последнее время были клонированы АФП диатомовых водорослей (Janech *et al.*, 2006) и антарктической бактерии (Raymond *et al.*, 2007), эти белки показали высокую гомологию с АФП грибов (Xiao *et al.*, 2010). Есть все основания

считать, что гомологи АФП грибов широко распространены в нескольких царствах, благодаря возможному горизонтальному переносу генов между эукариотическими микробами и прокариотами (Raymond *et al.*, 2007).

У антарктических бельдюговых рыб (*Zoarcidae*) удалось реконструировать происхождение АФП III типа путем дупликации и дивергенции от древнего гена синтазы сиаловой кислоты (SAS) (Deng *et al.*, 2010). Дуплицированный ген SAS сочетает синтазу сиаловой кислоты и рудиментарную активность связывания со льдом. У одной из копий N-концевой SAS-домен был делетирован и замещен возникшим сигнальным пептидом, что снимало плеiotропный конфликт между функциями SAS и связывания со льдом и позволяло быстро оптимизировать C-концевой домен, чтобы он стал секреторным белком, способным к ТН. Этот пример иллюстрирует эволюционную модель избегания адаптационного конфликта, согласно которой адаптивный конфликт между старой и формирующейся новой функцией одного гена может приводить к фиксации дупликации гена, при этом у каждой копии происходит оптимизация одной из функций.

Количество копий генов АФП рыб может значительно варьировать внутри одного вида. Так, у бельдюги *M. americanus* выявляется 40 копий гена АФП в южных широтах и около 150 копий в северных, что говорит о селективном давлении среды в сторону увеличения числа копий гена (Hew *et al.*, 1988). Это важное адаптивное свойство при колонизации новых мест обитания.

Полипротеин АФП III типа бельдюги *Lycodichthys dearborni* состоит из 12 tandemных повторов, каждый из которых транслируется в 7 кДа молекулу АФП (Yu *et al.*, 2005). Организация этого гена аналогична организации генов АФП рыб. АФП III и АФП II отличаются по составу и структуре, они выявлены в различных систематических таксонах, однако сходная структура генов этих АФП свидетельствует о наличии у рыб общего механизма организации участков геномов, отвечающих за приспособление к экстремальным условиям полярных ареалов (Deng *et al.*, 2010).

Насекомые. Мало известно о событиях и процессах, которые были движущей силой

эволюции АФП насекомых. Изученные виды жесткокрылых и чешуекрылых экспрессируют множество изоформ АФП в жидкостях организма (Kristiansen *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2007), отличающихся по числу копий внутреннего повтора (Graham *et al.*, 1997; Tyshenko *et al.*, 1997; Liou *et al.*, 1999; Doucet *et al.*, 2000). АФП *Dendroides canadensis* являются гомологами (Andorfer, Duman, 2000). В гемолимфе, жидкости кишки и эпидермисе личинок *Dendroides canadensis* присутствуют специфические варианты АФП (Graham *et al.*, 2000). Это показывает, что АФП могли эволюционировать, приобретая специфические функции. Например, группа I АФП *Dendroides canadensis* является более эффективной в ингибировании белков нуклеаторов льда гемолимфы, а группы II и III АФП могут быть эффективнее в ингибировании бактерий нуклеаторов льда в кишечнике. Другая возможность состоит в том, что АФП кишечника могут быть более устойчивыми к протеазам.

Как и в случае АФП рыб, среди насекомых показано появление структурных аналогов, например, RiAFP жука *Rhagium inquisitor* и iwAFP пяденицы *C. peralta* (Kristiansen *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). Как у жуков (Liou *et al.*, 2000), так и у молей (Leinala *et al.*, 2002a) АФП являются β -спиральными и содержат ряды остатков Thr на сайте связывания льда (Graether *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002). Оба вида АФП при увеличении числа повторов и, следовательно, размера поверхности связывания льда демонстрируют повышение ТН-активности (Leinala *et al.*, 2002b; Marshall *et al.*, 2004). Несмотря на сходство, АФП жуков и молей отличаются по первичной последовательности, количеству и расположению дисульфидных мостиков, а также имеют спиральную структуру разной направленности (Graether, Sykes, 2004; Qin *et al.*, 2007).

Открытие АФП *Rhagium inquisitor* имеет большое значение для понимания эволюции АФП насекомых, так как RiAFP представляет собой совершенно новый тип АФП по сравнению с описанными у других видов жуков (Kristiansen *et al.*, 2011). Не связанные между собой филогенетически АФП также выявлены в отряде чешуекрылых – iwAFP (*Campaea peralta*) (Lin *et al.*, 2011) и sbwAFP (*Choristoneura fumiferana*) (Tyshenko *et al.*, 1997). Таким образом, можно

сделать вывод о том, что адаптация к экологическому стрессу привела к возникновению АФП у близких видов насекомых уже после того, как они отделились от общего предка.

Множественность генов АФП у насекомых дает возможность гибко регулировать уровень транскрипции, способствует высокому уровню ТН и, следовательно, стратегии избегания замораживания, при этом некоторые изоформы синтезируются в различных тканях или экспрессируются в разное время в течение зимы (Andorfer, Duman, 2000). Сами гены состоят из повторяющихся блоков, которые привели к пластичной ТН-активности, так как более длинные изоформы имеют большую активность.

Растения. АФП были выделены из 6 растений, определена полная нуклеотидная последовательность 5 из них (табл. 1). Отличительной чертой АФП растений является то, что многие из них гомологичны PR-белкам (Hon *et al.*, 1995; Yaish *et al.*, 2006). Как правило, PR-белки выделяются в апопласт в ответ на возбудителя инфекции и действуют кооперативно, деградируя грибковые клеточные стенки ферментативно и подавляя грибковые ферменты. Показано, что АФП ржи не подвергаются модификации после трансляции, что говорит о существовании отдельной группы индуцируемых холодом PR-белков с антифризной активностью и группы родственных белков, у которых этой активности нет. Появление PR-белков с антифризной активностью может быть следствием дубликации предковой формы гена PR-белка с последующим появлением у одной из копий сайта связывания со льдом (Yeh *et al.*, 2000).

Один из АФП сладко-горького паслена *Solanum dulcamara* (*sthp-64*) сходен с транскрипционными факторами растений WRKY, регулирующими экспрессию белков устойчивости к патогенам (Huang, Duman, 2002). Структура *sthp-64* также напоминает структуру АФП животных.

АФП моркови имеет большую гомологию с белком-ингибитором полигалактуроназы (50–65 % гомологии), но сам не ингибирует полигалактуроназу (Worrall *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006). Около 74 % зрелых последовательностей АФП моркови составляют насыщенные лейцином повторы (leucine-rich repeat, LRR), что является общим свойством

генов резистентности и обеспечивает быстро развивающуюся специфичность к новым патогенам (Meyer *et al.*, 1999). Вполне возможно, что район LRR приобрел способность связываться со льдом, и теперь белок может функционировать только как АФП (Worrall *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999). Есть все основания предполагать, что АФП моркови в недавнее время произошел от PGIP-подобного предшественника путем дубликации генов (Yaish *et al.*, 2006). В связи с этим следует отметить, что был выделен еще один PGIP-подобный белок моркови, который имеет 75 %-ю гомологию с аминокислотной последовательностью АФП моркови (Meyer *et al.*, 1999). Этот АФП-подобный ген хотя и индуцируется воздействием холода, в отличие от *DcAFP* характеризуется значительным уровнем экспрессии в тканях незакаленных растений. Это может означать, что низкотемпературная индукция экспрессии гена АФП произошла от более общих, стресс-индуцированных, способностей экспрессии генов.

Гены АФП мягкой пшеницы (*TaIRI1* и *TaIRI2*) имеют уникальную структуру, они состоят из двух частей, что никогда ранее не было описано для АФП (Tremblay *et al.*, 2005). В отличие от уже известных АФП, они имеют N-концевой участок, гомологичный лейцин-насыщенным повторам рецепторного домена (LRR) протеинкиназ (receptor-like kinases – RLKs), и C-концевой домен, который гомологичен связывающему лед домену некоторых АФП (IRI-домен).

Наибольшее сходство белков *TaIRI* и RLK выявлено с предполагаемым белком *Oryza sativa* – киназой рецептора фитосульфоксина (*OsPSR*). Показано, что *TaIRI1*-белок не имеет киназной активности, что не удивительно, так как он имеет гомологию с RLKs в рецепторной области последних, а не с доменом киназы. Высокое сходство частей *TaIRI*-генов, фланкирующих IRI домен, и *OsPSR* позволяет предположить, что ДНК области кодирования IRI-домена являются инсерцией в кодирующую область ортолога *OsPSR* у пшеницы (Tremblay *et al.*, 2005; Sandve *et al.*, 2008).

Происхождение последовательности, кодирующей IRI-повтор, остается неясным, так как она не проявляет сходства с какой-либо последовательностью аминокислот (John *et al.*, 2009).

Гены, кодирующие IRIP-гомологи, монофилетичны по происхождению, и их распространение ограничивается подсемейством мятликовых (*Pooideae*). На основе статистического анализа предполагают, что IRIP возникла в начале эволюционной истории *Pooideae* и впоследствии произошла дивергенция по числу копий и структуре. IRIP-гены возникли после расхождения подсемейств *Pooideae* и *Panicoideae* 60 млн лет назад, но до расхождения *Triticodae* и *Poodeae* 35 млн лет назад.

Заключение

Способность АФП взаимодействовать со льдом определяет их важность для организма: они нейтрализуют нуклеаторы льда, способствуя переохлаждению; снижают температуру замерзания жидкости организма; играют криопротекторную роль в отношении некоторых мембран и белков; модифицируют форму кристаллов льда и останавливают их рост. Многие АФП имеют множественные изоформы, гены АФП являются представителями семейств родственных генов, отдельные представители этих семейств могут по-разному экспрессироваться в определенных частях организма или отдельных тканях. На уровень активности АФП влияют как факторы внешней среды, так и факторы, зависящие от самого организма, в том числе гормоны и стадия развития. К внутренним факторам также относятся: количество генов и изоформ АФП, концентрация АФП, число повторов структурных элементов сайта связывания льда, наличие низкомолекулярных энхансеров, присутствие других белков, выступающих в роли усилителей.

Эволюция АФП характеризуется возникновением неродственных типов АФП внутри одного и того же таксона, а также конвергентной эволюцией, при которой сходные структуры АФП появляются у отдаленных видов. Удивительное разнообразие АФП наряду с очень узким распространением внутри таксонов привело к гипотезе о том, что типы АФП возникли независимо друг от друга во время недавних с точки зрения геологической истории событий охлаждения и оледенения, после того как сформировались современные отряды и виды животных и растений. Еще одной при-

чиной разнообразия АФП может быть то, что кристалл льда имеет множество поверхностей с различным геометрическим расположением атомов кислорода.

АФП имеют два контрастных пути происхождения. Некоторые из них возникли путем дегенерации отдельных членов семейств белков, имеющих совершенно несвязанные с АФП функции. Другие могут считаться по-настоящему новыми белками, чьи гены появились вследствие сравнительно недавних генетических событий. В отдельных случаях исследователи предполагают горизонтальный перенос генов АФП между неродственными таксонами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-00178) и Госконтракта № 16.512.11.2223.

Литература

- Самыгин Г.А. Образование льда в растениях // Физиол. растений. 1997. Т. 44. № 2. С. 275–286.
- Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.
- Amornwittawat N., Wang S., Duman J.G. *et al.* Polycarboxylates enhance beetle antifreeze protein activity // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. No 12. P. 1942–1948.
- Andorfer C.A., Duman J.G. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* // J. Insect Physiol. 2000. V. 46. P. 365–372.
- Antikainen M., Griffith M. Antifreeze accumulation in freezing tolerant cereals // Physiol. Plant. 1997. V. 99. P. 423–432.
- Antikainen M., Griffith M., Zhang J. *et al.* Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing // Plant Physiol. 1996. V. 110. P. 845–857.
- Baardsnes J., Kondejewski L.H., Hodges R.S. *et al.* New ice-binding face for type I antifreeze protein // FEBS Lett. 1999. V. 463. No 1/2. P. 87–91.
- Baardsnes J., Kuiper M.J., Davies P.L. Antifreeze protein dimer: when two ice-binding faces are better than one // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. No 40. P. 38942–38947.
- Barrett J. Thermal hysteresis proteins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. V. 33. No 2. P. 105–117.
- Bayer-Giraldi M., Weikusat I., Besir H. *et al.* Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilaria cylindrus* and its relevance in sea ice // Cryobiology. 2011. V. 63. No 3. P. 210–219.
- Bilyk K.T., DeVries A.L. Delayed onset of adult antifreeze activity juveniles of the Antarctic icefish *Chaenocephalus aceratus* // Polar Biol. 2011. DOI 10.1007/s00300-010-0828-6 (Published on line).
- Bouvet V.R., Lorello G.R., Ben R.N. Aggregation of antifreeze glycoprotein fraction 8 and its effect on antifreeze activity // Biomacromol. 2006. V. 7. No 2. P. 565–571.
- Bravo L.A., Griffith M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 1189–1196.
- Cheng C.H. Origin and mechanism of evolution of antifreeze glycoproteins in polar fishes // Evolution of the Antarctic Ichthyofauna / Eds G. di Prisco, E. Pisano, A. Clarke. Springer-Verlag, Italy, 1998. P. 311–328.
- Cheng C.H., Chen L. Evolution of an antifreeze glycoprotein // Nature. 1999. V. 401. No 6752. P. 443–444.
- Cziko P.A., Evans C.W., Cheng C.-H.C. *et al.* Freezing resistance of antifreeze-deficient larval Antarctic fish // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 407–420.
- Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J. *et al.* Structure and function of antifreeze proteins // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 2002. V. 357. P. 927–935.
- Davies P.L., Sykes B.D. Antifreeze proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. V. 7. P. 828–834.
- Deng C., Cheng C.H., Ye H. *et al.* Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. No 50. P. 21593–21598.
- Desjardins M., Le Francois N.R., Fletcher G.L. *et al.* Seasonal modulation of plasma antifreeze protein levels in Atlantic (*Anarhichas lupus*) and spotted wolffish (*A. minor*) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006. V. 335. P. 142–150.
- DeVries A.L. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water // Methods in Enzymology. 1986. V. 127. P. 293–303.
- DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes // Sci. 1969. V. 163. P. 1073–1075.
- Doucet C.J., Byass L., Elias L. *et al.* Distribution and characterization of recrystallization inhibitor activity in plant and lichen species from the UK and maritime Antarctic // Cryobiology. 2000. V. 40. No 3. P. 218–227.
- Doucet D., Walker V.K., Qin W. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects // Cell Mol. Life Sci. 2009. V. 66. No 8. P. 1404–1418.
- Duman J.G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara* // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 129–135.
- Duman J.G., Bennett V., Sformo T. *et al.* Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders // J. Insect Physiol. 2004. V. 50. P. 259–266.
- Duman J.G., Olsen T.M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants // Cryobiology. 1993. V. 30. P. 322–328.
- Duman J.G., Verleye D., Li N. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis* // J. Comp. Physiol. [B]. 2002. V. 172. No 6. P. 547–552.
- Duncker B.P., Koops M.D., Walker V.K. *et al.* Low temperature persistence of type I antifreeze protein is mediated by cold-specific mRNA stability // FEBS Lett. 1995. V. 377. P. 185–188.
- Ebbinghaus S., Meister K., Born B. *et al.* Antifreeze glycoprotein activity correlates with long-range protein-water dynamics // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. No 35. P. 12210–12211.

- Evans R.P., Fletcher G.L. Type I antifreeze proteins: possible origins from chorion and keratin genes in Atlantic snailfish // *J. Mol. Evol.* 2005. V. 61. No 4. P. 417–424.
- Evans R.P., Hobbs R.S., Goddard S.V. *et al.* The importance of dissolved salts to the *in vivo* efficacy of antifreeze proteins // *Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol.* 2007. V. 148. No 3. P. 556–561.
- 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. V. 37. No 12. P. 4080–4085.
- Ewart K.V., Lin Q., Hew C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins // *Cell. Mol. Life Sci.* 1999. V. 55. P. 271–283.
- 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. V. 38. No 2. P. 172–183.
- Fletcher G.L., Goddard S.V., Wu Y. Antifreeze proteins and their genes: from basic research to business opportunity // *Chemtech.* 1999. V. 30. P. 17–28.
- Fletcher G.L., Hew C.L., Davies P.L. Antifreeze proteins of teleost fishes // *Annu. Rev. Physiol.* 2001. V. 63. P. 359–390.
- Garnham C.P., Campbell R.L., Davies P.L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. No 18. P. 7363–7367.
- Gauthier S.Y., Marshall C.B., Fletcher G.L. *et al.* Hyperactive antifreeze protein in flounder species. The sole freeze protectant in American plaice // *FEBS J.* 2005. V. 272. No 17. P. 4439–4449.
- Gilbert J.A., Davies P.L., Laybourn-Parry J. A hyperactive, Ca²⁺-dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium // *JFEMS Microbiol. Lett.* 2005. V. 245. No 1. P. 67–72.
- Gong Z., Ewart K.V., Hu Z. *et al.* Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 4106–4112.
- Gong Z., King M.J., Fletcher G.L. *et al.* The antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, are differentially regulated in liver and non-liver tissues // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 206. P. 387–392.
- Gozzo F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. No 16. P. 4487–4503.
- 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. V. 406. No 6793. P. 249–251.
- Graether S.P., Sykes B.D. Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. No 16. P. 3285–3296.
- Graham L.A., Davies P.L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas // *Sci.* 2005. V. 310. P. 461.
- Graham L.A., Liou Y.C., Walker V.K. *et al.* Hyperactive antifreeze protein from beetles // *Nature.* 1997. V. 388. No 6644. P. 727–728.
- Graham L.A., Loughheed S.C., Ewart K.V. *et al.* Lateral transfer of a lectin-like antifreeze protein gene in fishes // *PLoS ONE.* 2008a. V. 3. No 7. P. e2616.
- Graham L.A., Marshall C.B., Lin F.H. *et al.* Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites // *Biochemistry.* 2008b. V. 47. No 7. P. 2051–2063.
- Graham L.A., Qin W., Loughheed S.C. *et al.* Evolution of hyperactive, repetitive antifreeze proteins in beetles // *J. Mol. Evol.* 2007. V. 64. No 4. P. 387–398.
- 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. V. 267. P. 6452–6458.
- Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities // *Trends Plant. Sci.* 2004. V. 9. No 8. P. 399–405.
- Hawes T.C., Marshall C.J., Wharton D.A. Antifreeze proteins in the Antarctic springtail, *Gressittacantha terranova* // *J. Comp. Physiol. B.* 2011. V. 181. No 6. P. 713–719.
- Harding M.M., Anderberg P.I., Haymet A.D. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish // *Eur. J. Biochem.* 2003. V. 270. No 7. P. 1381–1392.
- 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. V. 264. No 3. P. 653–665.
- Hew C. L., Wang N. C., Joshi S. *et al.* Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. P. 12049–12055.
- Hobbs R.S., Shears M.A., Graham L.A. *et al.* Isolation and characterization of type I antifreeze proteins from cunner, *Tautoglabrus adspersus*, order Perciformes // *FEBS J.* 2011 V. 278. No 19. P. 3699–3710.
- Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A. *et al.* Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins // *Plant Physiol.* 1995. V. 109. P. 879–889.
- 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. V. 151. P. 233–240.
- Hsiao K.C., Cheng C.H., Fernandes I.E. *et al.* An antifreeze glycopeptide gene from the antarctic cod *Notothenia coriiceps neglecta* encodes a polypeptide of high peptide copy number // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. No 23. P. 9265–9269.
- 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. V. 48. No 4. P. 339–350.
- Janech M.G., Krell A., Mock T. *et al.* Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae) // *J. Phycol.* 2006. V. 42. No 2. P. 410–416.
- Jarzbek M., Pukacki P.M., Nuc K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* sp.) // *Cryobiology.* 2009. V. 58. P. 268–274.
- Jia Z., Davies P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor ligand interaction // *Trends Biochem. Sci.* 2002. V. 27. No 2. P. 101–106.
- Jin Y., DeVries A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antar-

- ctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2006. V. 144. No 3. P. 290–300.
- John U.P., Polotnianka R.M., Sivakumaran K.A. *et al.* Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv // *Plant, Cell and Environment*. 2009. V. 32. No 4. P. 336–348.
- Knight C.A., Cheng C.C., DeVries A.L. Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes // *Biophys J.* 1991. V. 59. No 2. P. 409–418.
- Knight C.A., DeVries A.L. Ice growth in supercooled solutions of a biological «antifreeze», AFGP 1-5: an explanation in terms of adsorption rate for the concentration dependence of the freezing point // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009. V. 11. No 27. P. 5749–5761.
- Knight C.A., DeVries A.L., Oolman L.D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice // *Nature*. 1984. V. 308. P. 295–296.
- Knight C.A., Wen D., Laursen R.A. Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice // *Cryobiology*. 1995. V. 32. P. 23–34.
- Kristiansen E., Pedersen S.A., Zachariassen K.E. Salt-induced enhancement of antifreeze protein activity: a salting-out effect // *Cryobiology*. 2008. V. 57. No 2. P. 122–129.
- Kristiansen E., Ramløv H., Hagen L. *et al.* Isolation and characterization of hemolymph antifreeze proteins from larvae of the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* (L.) // *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 142. No 1. P. 90–97.
- Kristiansen E., Ramløv H., Højrup P. *et al.* Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2011. V. 41. No 2. P. 109–117.
- Kristiansen E., Pedersen S.A., Ramløv H. *et al.* Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor* // *J. Comp. Physiol. B.* 1999. V. 169. P. 55–60.
- Kristiansen E., Zachariassen K.E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis // *Cryobiology*. 2005. V. 51. No 3. P. 262–280.
- Laursen K.J., Brown A.J., Middleton A.J. *et al.* Expression and characterization of an antifreeze protein from the perennial rye grass, *Lolium perenne* // *Cryobiology*. 2011. V. 62. P. 194–201.
- Lee J.K., Park K.S., Park S. *et al.* An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast // *Cryobiology*. 2010. V. 60. No 2. P. 222–228.
- Lee J.K., Kim Y.J., Park K.S. *et al.* Molecular and comparative analyses of type IV antifreeze proteins (AFPIVs) from two Antarctic fishes, *Pleuragramma antarcticum* and *Notothenia coriiceps* // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2011. V. 159. No 4. P. 197–205.
- Leinälä E.K., Davies P.L., Jia Z. Crystal structure of beta-helical antifreeze protein points to a general ice binding model // *Structure*. 2002a. V. 10. No 5. P. 619–627.
- Leinälä E.K., Davies P.L., Doucet D. *et al.* A beta-helical antifreeze protein isoform with increased activity: structural and functional insights // *J. Biol. Chem.* 2002b. V. 277. P. 33349–33352.
- Li N., Andorfer C.A., Duman J.G. Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass // *J. Exp. Biol.* 1998. V. 201. P. 2243–2251.
- Li N., Kendrick B.S., Manning M.C. *et al.* Secondary structure of antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 360. P. 25–32.
- Lin F.H., Davies P.L., Graham L.A. The Thr- and Ala-rich hyperactive antifreeze protein from inchworm folds as a flat silk-like β -helix // *Biochemistry*. 2011. V. 50. No 21. P. 4467–4478.
- Lin F.H., Graham L.A., Campbell R.L. *et al.* Structural modeling of snow flea antifreeze protein // *Biophys. J.* 2007. V. 92. No 5. P. 1717–1723.
- Lin X., O'Tousa J.E., Duman J.G. Expression of two self-enhancing antifreeze proteins from the beetle *Dendroides canadensis* in *Drosophila melanogaster* // *J. Insect Physiol.* 2010. V. 56. No 4. P. 341–349.
- 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. V. 19. No 1. P. 148–157.
- Liou Y.C., Thibault P., Walker V.K. *et al.* A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor* // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 11415–11424.
- Liu Y., Li Z., Lin Q. *et al.* Structure and evolutionary origin of Ca²⁺-dependent herring type II antifreeze protein // *PLoS ONE*. 2007. V. 2. No 6. P. e548.
- Mao X., Liu Z., Ma J. *et al.* Characterization of a novel β -helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita* // *Cryobiology*. 2011. V. 62. No 2. P. 91–99.
- Marentes E., Griffith M., Mlynarz A. *et al.* Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation // *Physiol. Plant.* 1993. V. 87. P. 499–507.
- 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. V. 280. No 18. P. 17920–17929.
- 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. V. 529. No 2/3. P. 261–267.
- Marshall C.B., Daley M.E., Sykes B.D. *et al.* Enhancing the activity of a beta-helical antifreeze protein by the engineered addition of coils // *Biochemistry*. 2004. V. 43. No 37. P. 11637–11646.
- Meyer K., Keil M., Naldrett M.J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity // *FEBS Lett.* 1999. V. 447. No 2/3. P. 171–178.
- Middleton A.J., Brown A.M., Davies P.L. *et al.* Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein // *FEBS Lett.* 2009. V. 583. No 4. P. 815–819.
- 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. V. 126. No 2. P. 387–394.
- Moffatt B., Ewart V., Eastman A. Cold comfort: plant antifreeze proteins // *Physiol. Plantarum*. 2006. V. 126. P. 5–16.
- Mok Y.F., Lin F.H., Graham L.A. *et al.* Structural basis for the superior activity of the large isoform of snow flea antifreeze protein // *Biochemistry*. 2010. V. 49. P. 2593–2603.

- Nishimiya Y., Kondo H., Takamichi M. *et al.* Crystal structure and mutational analysis of Ca²⁺-independent type II antifreeze protein from longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus* // J. Mol. Biol. 2008. V. 382. No 3. P. 734–746.
- Parody-Morreale A., Murphy K.P., Di Cera E. Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins // Nature. 1988. V. 333. P. 782–783.
- Pertaya N., Marshall C.B., Celik Y. *et al.* Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity // Biophys. J. 2008. V. 95. No 1. P. 333–341.
- Pertaya N., Marshall C.B., DiPrinzio C.L. *et al.* Fluorescence microscopy evidence for quasi-permanent attachment of antifreeze proteins to ice surfaces // Biophys. J. 2007. V. 92. No 10. P. 3663–3673.
- 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. V. 410. No 2. P. 238–245.
- Qin W., Doucet D., Tyshenko M.G. *et al.* Transcription of antifreeze protein genes in *Choristoneura fumiferana* // Insect Mol. Biol. 2007. V. 16. No 4. P. 423–434.
- Qin W., Tyshenko M.G., Doucet D. *et al.* Characterization of antifreeze protein gene expression in summer spruce budworm larvae // Insect Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 36. No 3. P. 210–218.
- Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation // Gene. 2006. V. 367. P. 142–149.
- Raymond J.A., Fritsen C., Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 61. No 2. P. 214–221.
- 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. V. 46. No 2. P. 174–181.
- Sandve S.R., Rudi H., Asp T. *et al.* Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8. P. 245.
- Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. *et al.* The basis for hyperactivity of antifreeze proteins // Cryobiology. 2006. V. 53. No 2. P. 229–239.
- Smallwood M., Worrall D., Byass L. *et al.* Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) // Biochem. J. 1999. V. 340. Pt. 2. P. 385–391.
- Tam R.Y., Rowley C.N., Petrov I. *et al.* Solution conformation of C-linked antifreeze glycoprotein analogues and modulation of ice recrystallization // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. No 43. P. 15745–15753.
- 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. V. 46. No 6. P. 884–891.
- Tyshenko M.G., Doucet D., Davies P.L. *et al.* The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 887–890.
- Uda Y., Zepeda S., Kaneko F. *et al.* Adsorption-induced conformational changes of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. No 51. P. 14355–14361.
- Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins // Biochem. Biophys. Acta. 1992. V. 1121. No 1/2. P. 199–206.
- Wang S., Amornwittawat N., Juwita V. *et al.* Arginine, a key residue for the enhancing ability of an antifreeze protein of the beetle *Dendroides canadensis* // Biochemistry. 2009. V. 48. No 40. P. 9696–9703.
- 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. V. 4. No 2. P. 135–147.
- Wang L., Duman J.G. A thaumatin-like protein from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* enhances the activity of antifreeze proteins // Biochemistry. 2006. V. 45. No 4. P. 1278–1284.
- Wharton D.A., Barrett J., Goodall G. *et al.* Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* // Cryobiology. 2005. V. 51. No 2. P. 198–207.
- 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. V. 37. No 6. P. 1006–1010.
- Wierzbicki A., Knight C.A., Salter E.A. *et al.* The role of non-polar amino acid functional groups in the surface-orientation-dependent adsorption of natural and synthetic antifreeze peptides on ice // Crystal Growth Design. 2008. V. 8. P. 3420–3429.
- Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D. *et al.* Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. No 7. P. 749–771.
- Wisniewski M., Webb R., Balsamo R. *et al.* Purification, immunolocalization, cryoprotective and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*) // Physiol. Plant. 1999. V. 105. P. 600–608.
- Worrall D., Elias L., Ashford D. *et al.* A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization // Science. 1998. V. 282. No 5386. P. 115–117.
- Wu Y., Banoub J., Goddard S.V. *et al.* Antifreeze glycoproteins: relationship between molecular weight, thermal hysteresis and the inhibition of leakage from liposomes during thermotropic phase transition // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 128. No 2. P. 265–273.
- Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y. *et al.* Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis* // FEBS J. 2010. V. 277. No 2. P. 394–403.
- Yaish M.W., Doxey A.C., McConkey B.J. *et al.* Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity // Plant Physiol. 2006. V. 141. No 4. P. 1459–1472.
- Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M. *et al.* Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 1251–1264.
- Yu S.O., Brown A., Middleton A.J. *et al.* Ice restructuring inhibition activities in antifreeze proteins with distinct differences in thermal hysteresis // Cryobiology. 2010. V. 61. P. 327–334.
- 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. V. 32. No 8. P. 789–794.

- Zachariassen K.E., DeVries A.L., Hunt B. *et al.* Effect of ice fraction and dilution factor on the antifreeze activity in the hemolymph of the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor* // *Cryobiology*. 2002. V. 44. No 2. P. 132–141.
- Zachariassen K.E., Kristiansen E. Ice nucleation and anti-nucleation in nature // *Cryobiology*. 2000. V. 41. No 4. P. 257–279.
- Zhang J., Deng C., Wang J. *et al.* Identification of a two-domain antifreeze protein gene in Antarctic eelpout *Lycodichthys dearborni* // *Polar Biology*. 2009. V. 32. P. 35–40.
- Zhang D.Q., Liu B., Feng D.R. *et al.* Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants // *Protein Expr. Purif.* 2004. V. 35. No 2. P. 257–263.
- 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. V. 33. No 11. P. 1027–1036.
- 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. V. 55. No 23. P. 9620–9626.
- Zhang C., Fei S.Z., Arora R. *et al.* Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance // *Planta*. 2010. V. 232. No 1. P. 155–164.

THE MAIN PROPERTIES AND EVOLUTIONARY FEATURES OF ANTIFREEZE PROTEINS

L.L. Bildanova, E.A. Salina, V.K. Shumny

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: larisab@bionet.nsc.ru

Summary

Antifreeze proteins are a class of proteins synthesized by poikilothermic organisms under cold stress. These proteins have random phylogenetic distribution, differ in primary and secondary structures, have different regulatory pathways, but they all display a common feature: the ability to be adsorbed onto the surface of ice crystals and to modify their growth. The review summarizes data on the origin of antifreeze proteins, activities and mechanisms mediating their action with emphasis on cereals, including wheat.

Key words: antifreeze protein (AFP), ice recrystallization inhibition (IRI), thermal hysteresis (TH), ice-binding proteins, freeze tolerance, freeze avoidance, cold acclimation, protein structure, protein evolution, cereals, wheat.