



Białka termicznej histerezy — struktura, funkcja, znaczenie użytkowe

Marianna Turkiewicz
Instytut Biochemii Technicznej
Politechnika Łódzka
Łódź

1. Wprowadzenie

Woda jest zasadniczym składnikiem ziemskiego środowiska, występującym we wszystkich warstwach naszej planety, a także głównym komponentem biosfery.

Dipolarny charakter tetraedrycznych cząsteczek wody sprzyja ich łączeniu się w uporządkowanym geometrycznie szyku za pomocą wiązań wodorowych, będących w istocie oddziaływaniami elektrostatycznymi między jądrem wodoru jednej molekuly a parą wolnych elektronów drugiej. Ze względu na ich przemijający charakter ($\tau_{1/2}$ asocjacji — dysocjacji cząsteczek wody w stanie ciekłym wynosi 1 μ s) — woda pozostaje cieczą (1-3).

W miarę usuwania ciepła z układów wodnych wiązania wodorowe między cząsteczkami wody stają się coraz stabilniejsze i wreszcie, poniżej punktu krzepnięcia, woda zamienia się w lód.

Zamarznięcie jest dla większości organizmów letalne. Wewnątrzkomórkowe tworzenie się lodu niemal zawsze prowadzi do śmierci komórki, wskutek zniszczenia jej ultrastruktury. Tworzenie się lodu w przestrzeniach pozakomórkowych powoduje odwodnienie komórki, prowadzące do szoku osmotycznego, zateżenia cytozolu i wzrostu pH, a w końcu nawet do precypitacji normalnie rozpuszczonych składników (2-4). Utrata co najwyżej 65% wody wewnętrznej powoduje śmierć komórki. Kryształki lodu mogą też fizycznie uszkadzać błony biologiczne i kapilary, deformować komórki oraz zaburzać, a wreszcie powodować zanik kontaktów między nimi. Daje to również efekt letalny.

Liczne ustroje są narażone bądź przez całe życie, bądź też sezonowo, na zamarznięcie (4). Wykształciły się u nich rozmaite adaptacje, dzięki którym mogą one przeżyć w niesprzyjającym środowisku (tab. 1). Najbardziej istotne są wśród nich adaptacje biochemiczne, obserwowane przede wszystkim w organizmach ektotermicznych, a zwłaszcza hipostenotermicznych, z których wiele — przeważnie morskich — spędza całe życie w bardzo zimnym, zamarzającym środowisku, np. w wodach polarnych.

Jednym z najbardziej interesujących przystosowań do życia w środowisku obfitującym w lód, jest w ustrojach ektotermicznych ciągła bądź okresowa synteza specjalnej klasy peptydów i białek, określanych białkami termicznej histerezy (ang. *thermal hysteresis proteins* — THP), białkami przeciwlodowymi (ang. *antifreeze proteins* — AFP, fr. *antigel proteines*) lub też — rzadziej — białkami krioprotekcyjnymi (4-9).

Cechą charakterystyczną THP jest zdolność obniżania na drodze niekoligacyjnej (czyli w zależności nie od stężenia, a od rodzaju substancji krioprotekcyjnej) punktu krzepnięcia roztworów wodnych, bez zmiany wartości ich punktu topnienia, dzięki czemu te dwie wielkości stają się nierównoważnikowe, co określamy mianem termicznej histerezy. Niskocząsteczkowe soluty, takie jak np. sole, poliole i ich pochodne czy też aminokwasy, również wykazujące właściwości krioprotekcyjne, działają — odwrotnie niż AFP — na drodze koligacyjnej, ponadto zaś obniżone w ich obecności punkty krzepnięcia i topnienia roztworów wodnych pozostają równoważnikowe, tak jak w czystej wodzie.

Głównym celem THP, obecnych w cieczach ustrojowych jest niedopuszczenie do wewnątrzkomórkowego tworzenia się lodu (6). Białka te powodują zwykle stan przechłodzenia organizmu, w którym może dojść nawet do wityfikacji (zeszlenia się) wody; nie jest ona wówczas ani cieczą, ani ciałem stałym. Dla stanu przechłodzenia charakterystyczna jest blokada aktywności osmotycznej organizmu, zaobserwowana u wielu zimujących owadów, np. u muchy *Eurosta solidaginis* (10).

TABELA 1
ADAPTACJE KOMPENSUJĄCE OZIĘBIENIE I ZAPOBIEGAJĄCE ZAMARZANIU ORGANIZMÓW

Adaptacje	Przykłady
behawioralne	ucieczka z obszaru grożącego zamarznięciem, mająca zwykle charakter sezonowy, zagrzebywanie się w ziemi zwierząt hibernujących, zmiana miejsca przebywania w obrębie własnego ekosystemu na takie, które nie grozi zamarznięciem, np. niektóre ryby polarne latem żyjące na powierzchni oceanu, zimę spędzają w pobliżu dna
anatomiczne i fizjologiczne	odpowiednio szczelne pokrywy ciała zabezpieczające przed wnikaniem kryształków lodu do wnętrza ustroju, gromadzenie na okres zimy znacznych ilości lipidów zapasowych (głównie u zwierząt endotermicznych, ale też w drzewach iglastych), i in.
biochemiczne	<p>mają na celu podtrzymywanie metabolicznych regulacji i homeostazy oraz ochronę struktury i funkcji komórek przed skutkami oziębienia i tworzenia się lodu. Adaptacje te obejmują:</p> <ul style="list-style-type: none"> • syntezę membran o zmienionym składzie lipidów; • syntezę specjalnych wariantów białek, głównie enzymatycznych; • obniżenie optymalnej temperatury procesów komórkowych; • utrzymanie równowagi między procesami dostarczającymi i zużywającymi ATP, a także pasywnymi; • ograniczenie występowania lodu do pozakomórkowych przedziałów; • akumulację niskocząsteczkowych krioprotektantów (glicerol, monosacharydy i ich pochodne, aminokwasy), w celu zwiększenia ilości „niezamarzającej” wody wewnętrznej w komórkach; • syntezę białek i peptydów termicznej histerezy (THP: AFPG i AFP); • sezonową syntezę tzw. białek nukleacyjnych (INP — <i>ice nucleating proteins</i>), indukujących i kontrolujących pozakomórkowe tworzenie się kryształów lodu o odpowiednio małych rozmiarach (np. u małży <i>Melampus edulis</i> i <i>bidentatus</i>, u roślin, itd.). Bardzo często są to lipoproteiny

Opracowano wg (4).

2. Właściwości i rozpowszechnienie białek przeciwlodowych

Białka krioprotekcyjne są znacznie bardziej rozpowszechnione w przyrodzie niż sądzono jeszcze w końcu lat siedemdziesiątych (9) i występują zarówno u zwierząt ektotermicznych, jak i u roślin, a nawet drobnoustrojów. Zostały one po raz pierwszy znalezione w nototeniach, antarktycznych rybach dorszowatych, żyjących w powierzchniowych wodach Południowego Oceanu

Lodowatego, których temperatura jest bliska punktowi krzepnięcia wody morskiej (-1,9°C), co sprawia, że wody te zawierają ciągle znaczne ilości lodu. Jego kryształy mogą wnikać do ryby poprzez skrzela, uszkodzoną pokrywę ciała, czy też przez przewód pokarmowy, a mimo to nototenie nie zamarzają (5). Ryby te — przeciwnie niż morskie bezkręgowce — nie są osmokoforami, a nawet ich krew jest nieco hipoosmotyczna względem otaczającej wody (6). Artur DeVries z Uniwersytetu w Urbanie, który odkrył THP, wykazał, że punkty topnienia surowicy krwi nototeni są zbliżone jak u ryb strefy umiarkowanej (odpowiednio, ok. -0,8 i -0,7°C), a za ich obniżenie w 85% odpowiada obecny we krwi NaCl, ponadto zaś jony K⁺, Ca²⁺, cząsteczki glukozy, mocznika i aminokwasów. Punkty topnienia surowicy krwi nototeni są natomiast znacznie niższe i mogą nawet dochodzić do -2,7°C (tab. 2) (5,6). Za tak dużą termiczną histerezę (1,7-1,9°C) są u tych ryb odpowiedzialne specjalne przeciwłodowe glikopeptydy i glikoproteiny (AFGP), wyizolowane przez DeVriesa w 1969 r. (12). Są to substancje nie dializujące przez błony o progu przepuszczalności 3 kDa, nie strąca je 10% TCA, nie denaturuje etanol i aceton, inaktywują je proteinyazy, ponadto zaś cechuje je znaczna termostabilność (5 min, 100°C) (5).

TABELA 2
PUNKTY KRZEPNIĘCIA I TOPNIENIA SUROWICY KRWI RYB ANTARKTYCZNYCH,
ŻYJĄCYCH NA RÓŻNYCH GŁĘBOKOŚCIACH

Gatunek (siedlisko)	Temp. wody	Surowica krwi		
	°C	PT °C	PK °C	TH °C
<i>Pagothenia borchgrewinki</i> (wody powierzchniowe wypełnione lodem)	-1,9	-1,1	-2,7	1,6
<i>Lycodichthys dearboni</i> (wody głębokie wolne od lodu)	-1,9	-0,9	-2,0	1,1
<i>Chaenocephalus aceratus</i> (wody powierzchniowe, ograniczona ilość lodu)	-1,0	-0,9	-1,5	0,6

Opracowano wg (6).

Objaśnienia: PK (punkty krzepnięcia); PT (punkty topnienia); TH (termiczna histereza) = PT-PK.

Dotąd znaleziono AFP nie tylko w surowicy krwi i innych kompartmentach ryb antarktycznych, ale także sezonowo u ryb żyjących w północnych akwenach wód strefy umiarkowanej, m.in. u fląder, miętusów, głowaczy, śledzi, stynek, itp. (tab. 3) (8,9).

TABELA 3
GATUNKI PÓLNOATLANTYCKICH RYB, U KTÓRYCH ZNALEZIONO AFP

Typ AFP	Ryba	Nazwa gatunkowa
AFGP	dorsz atlantycki	<i>Gadus morhua</i>
	dorsz grenlandzki	<i>Gadus ogac</i>
	ryba dorszowata	<i>Microgadus tomcod</i>
AFP I typu	flądra północnoatlantycka	<i>Pleuronectes americanus</i>
	flądra żółtoogoniasta	<i>Pleuronectes ferrugineus</i>
	głowacze (liczne gatunki)	<i>Myxocephalus scorpius</i> <i>Myxocephalus aeneus</i>
AFP II typu	kruk morski	<i>Hemitriptenus americanus</i>
	stynka	<i>Osmerus mordax</i>
	śledź atlantycki	<i>Clupea harengus</i>
AFP III typu	miętus	<i>Macrozoarces americanus</i>
	wilk morski	<i>Anarchihas lupus</i>
	ostrogłów	<i>Ulvaria subbifurcata</i>
	ostropletowiec	<i>Pholis gunnelus</i>
	miętus Lavalą	<i>Lycodes lavalaei</i>
nieokreślony*	ryba śledziowata (ang. <i>cunner</i>)	<i>Alosa pseudoharengus</i> <i>Tantogolabrus adspersus</i>

Opracowano wg (9).

* Wykryto termiczną histerezę, ale nie zidentyfikowano AFP.

Oprócz ryb, krioprotekcyjne białka produkują także niektóre mięczaki, np. *Mytilus edulis*, żyjący w strefie międzyżyłkowej (11), a także liczne zimujące owady, u których występują sezonowo w hemolimfie oraz w płynie jelitowym (tab. 4). Ich występowanie opisano także w wijach i roztoczach antarktycznych (10).

TABELA 4
WYSTĘPOWANIE THP U OWADÓW

Owady wrażliwe na zamarznięcie	Owady tolerujące sezonowe zamarznięcie
larwy chrząszcza <i>Tenebrio molitor</i> <i>Meracantha contracta</i> chrząszcze z rodzin: <i>Tenebrionidae</i> , <i>Elateridae</i> , <i>Cucujidae</i> , <i>Pyrochroidae</i> , <i>Lamopyridae</i> i <i>Coccinellidae</i> karaluchy: np. <i>Parcoblatta pensylvanica</i> , mszyce: <i>Oneopeltus fasciatus</i> Mecoptera (<i>Boreus westwoodi</i>) niektóre zimujące pajęczaki np. <i>Phildromus</i>	chrząszcz <i>Dendroides canadensis</i>

Opracowano wg (10).

Należy podkreślić, że i u ziemnych stawonogów strefy umiarkowanej synteza THP indukuje temperatura poniżej 15°C, krótki fotookres i niska wilgotność powietrza. Stymulują ją także hormony juwenilne (13). Termiczna histereza cieczy ustrojowych owadów zimujących mieści się zwykle w zakresie 3-6°C, jednakże może dochodzić aż do 15°C (10).

Pierwsze doniesienia o występowaniu termicznej histerezy u roślin pochodzą z 1992 r. (14,15), jej poziom jest jednak niski i waha się w zakresie 0,2-0,7°C (14). Listę roślin wyższych i prymitywnych, syntetyzujących AFP zamieszczono w tabeli 5. Są wśród nich zboża, warzywa, kwiaty, trawy, zioła, paprocie, widłaki, skrzypy, mchy i ginko. Co ciekawe, THP stwierdzono tylko u nielicznych gatunków drzew, np. u topoli amerykańskiej oraz w żołądźkach białego dębu (9). Drzewa iglaste, takie jak np. czarny i biały świerk, jodła balsamiczna i kanadyjska nie wytwarzają białek przeciwlodowych, natomiast produkują w zimie duże ilości lipidów (9).

Ostatnio opisano THP u antarktycznych okrzemek *Nitichia stellata*, kolonizujących lód i *Porosita pseudodenticulata*, żyjących w toni wodnej (16). Białka te, wydzielane przez *N. stellata* do otoczenia sprawiają, że powierzchnia lodu staje się szorstka (wykazują tzw. *ice pitting activity*), co ułatwia wzrost glonu, a także zwiększa porcję światła dostępnego dla komórek, rozpraszając je.

THP stwierdzono także u pleśni (1994) i u bakterii (1991). U grzybów *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velupites*, *Coriolus versicollor* i *Stereum* sp. są produkowane sezonowo, natomiast u tzw. pleśni śniegowych, będących patogenami zbóż ozimych (*Coprinus psychromorbidus*, *Typhula incarnata* i *Mycosclerotina borealis*) — są wytwarzane w sposób ciągły (15). Wartość termicznej histerezy, którą te białka powodują u pleśni, nie przekracza 0,35°C (15). AFP stwierdzono także u kilku gatunków bakterii (*Rhodococcus erythropolis*, *Micrococcus cyphilus* i *Pseudomonas putida*) po ich kilkutygodniowej aklimatyzacji w 3°C (15). Aktywność histerezowa tych białek, podobnie jak u pleśni, nie przekracza 0,4°C.

W tabeli 6 przedstawiono lokalizację AFP w organizmach ryb, owadów i roślin.

Stężenie THP w surowicy krwi ryb polarnych wynosi 20-35 mg/ml, a u ryb północnych akwenów strefy umiarkowanej dochodzi w zimie do 10-20 mg/ml.

Aby zapewnić tak wysoki poziom białek przeciwlodowych, w genomach ryb są obecne liczne kopie ich genów (17-21):

- u nototeni antarktycznych kilkanaście kopii genów AFGP; każda kodyduje polibiałko, ulegające potranslacyjnemu rozszczepieniu na dojrzałe peptydy;
- u kruka morskiego 12-15 kopii;
- u miętusa antarktycznego 43 kopie;
- u miętusa nowofunlandzkiego 150 kopii;
- u wilka morskiego 80-85 kopii;
- u węgorzycy atlantyckiej 180 kopii.

TABELA 5
GATUNKI ROŚLIN, U KTÓRYCH STWIERDZONO TERMICZNĄ HISTEREZĘ

Gatunek	Nazwa pospolita
okrytozalążkowe	
<i>Alliaria petiolata</i>	czosnek gorczycowy
<i>Aster cordifolius</i>	aster leśny
<i>Avena sativa</i>	owies ozimy
<i>Barbaera vulgaris</i>	gorczycznik pospolity ozimy
<i>Brassica napus</i>	rzepak ozimy
<i>Brassica oleracea</i>	kapusta zwykła, brukselka, kapusta włoska
<i>Daucus carota</i>	marchew dzika i hodowlana
<i>Dicentra cucularia</i>	Dutchman's breeches
<i>Euphorbia serpens</i>	wilczomlec
<i>Hemerocallis fulva</i>	lilowiec, cebulki
<i>Hordeum vulgare</i>	jęczmień ozimy
<i>Hydrophyllum virginianum</i>	wielosił
<i>Plantago lanceolata</i>	babka lancetowata
<i>Plantago major</i>	babka liściasta
<i>Poa annua</i>	trawa (wiechlina roczna)
<i>Poa pratensis</i>	trawa
<i>Populus deltoides</i>	topola amerykańska
<i>Quercus alba</i>	biały dąb (żołądzie)
<i>Secale cereale</i>	żyto ozime
<i>Solanum dulcamera</i>	słodkora psiankowaty
<i>Solanum tuberosum</i>	ziemniak
<i>Stellaria media</i>	ptasie ziele
<i>Taraxacum officinale</i>	mniszek lekarski
<i>Triticum aestivum</i>	ozima i jara pszenica
<i>Triticale</i> sp.	triticall
<i>Vinca minor</i>	barwinek
<i>Viole</i> sp.	fiolki leśny
nagozalążkowe	
<i>Polystichum acrostichoides</i>	paproć
<i>Equisetum hyemale</i>	skrzyp
<i>Lycopodium dendroideum</i>	babimór
<i>Gynko bilboa</i>	ginko
<i>Mnium cuspidatum</i>	mech
<i>Polytrichum ohioense</i>	mech
<i>Brachythecium salebrosum</i>	mech

Opracowano wg (9).

TABELA 6
LOKALIZACJA THP W ORGANIZMACH EKTOTERMICZNYCH

Organizm	Lokalizacja białek przeciwlodowych
ryby	surowica krwi, płyny śródmiąższowe wszystkich tkanek z wyjątkiem mózgu, ciecz jelitowa, ciecz oczna, skóra, powierzchnia komórek nabłonkowych skrzelii
owady	hemolimfa, epiderma zlokalizowana bezpośrednio pod kutikulą, powierzchnie błon plazmatycznych, wewnątrz dwuwarstwy lipidowej
rośliny	apoplast (ksylem, ściany komórkowe, przestrzenie międzykomórkowe); znaczna część THP występuje na powierzchni komórek; stwierdzono je w różnych częściach zimujących roślin (łodygi, gałęzie, źdźbła liściowe, pączki, jagody, kwiaty, korzenie, bulwy, kłębry, cebulki)

Biosynteza THP u ryb polarnych ma charakter konstytucyjny. Wysokie stężenie tych białek jest także utrzymywane dzięki stabilności ich mRNA, niskiego tempa obrotu tych białek (np. AFGP nr 7 i 8 u *Dissostichus mawsonii* mają $\tau_{1/2} = 60$ dni) oraz występowaniu w ich DNA sekwencji wzmacniających wydajność transkrypcji.

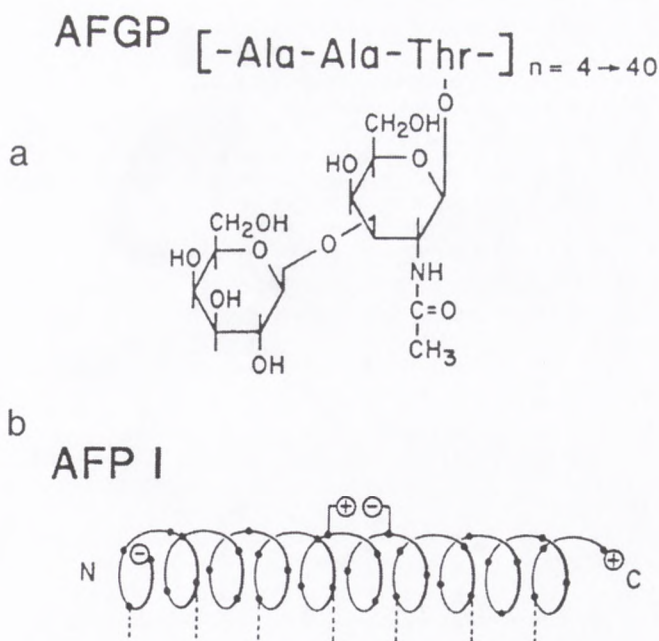
3. Charakterystyka molekularna białek przeciwlodowych

Najlepiej poznano strukturę molekularną czterech rodzajów THP ryb (tab. 7). Zwykle ryba wytwarza kilka wariantów tego samego typu białka przeciwlodowego, różniących się albo masą, albo wykazujących stosunkowo ograniczone różnice sekwencyjne (6,8,22,23).

TABELA 7
OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA GŁÓWNYCH RODZAJÓW AFP RYB

Właściwości	AFGP	AFP I	AFP II	AFP III
masa cząsteczkowa, kDa	2,6-33 (8 wariantów)	3,3-4,5 (10 wariantów)	14,0-24,0	6,5-7,0 (7-13 wariantów)
sekwencja	(Ala-Ala-Thr) _n	bogata w Ala, 11-aminokwasowe odcinki w powtórzeniach	bogata w Cys	zrównoważona
struktura	prawdopodobnie lewoskrętna helisa typu poliproliny II	pojedyncza α -helisa	podobna do lektyny typu C	β -sandwich
węglowodan	disacharyd, wiązania O-glikozydowe	brak	u styńki reszty cukrowe związane N-glikozydowo	brak

Opracowano wg (9).



Rys. 1. Sekwencja aminokwasów i struktura disacharydu glikozującego AFGP (a); schemat helikalnej struktury AFP I typu, (b) (wg (8))

AFGP. Dotąd opisano i dość dobrze scharakteryzowano strukturę molekularną ośmiu AFGP, o których pierwszy doniósł DeVries, i które występują nie tylko u nototenii, ale także u innych ryb antarktycznych i północnych ryb dorszowatych (6,8,9). Dotąd nie udało się wykryć żadnego z tych peptydów i białek, jednakże widma CD oraz wyniki badań ich struktury, wykonanych za pomocą innych metod spektroskopowych (widma Ramana, NMR) wskazują, że tworzą one lewoskrętną helisę o bardzo regularnej sekwencji (6). Powtarza się w niej tripeptyd Ala-Ala-Thr, z którym poprzez γ -hydroksyl treoniny wiąże się wiązaniem α -0-glikozydowym disacharyd 3-0- β -D-galaktopiranozylo-2-N-acetylogalaktozamina (rys. 1 a) (8). W trzech AFGP o najmniejszej masie każda pierwsza alanina w tripeptydzie jest podstawiona przez prolinę. Reszty sacharydowe w AFGP są skierowane równolegle do długiej osi helisy i ułożone w taki sposób, że ich grupy hydroksylowe są eksponowane na zewnątrz molekuly. Reszty alaniny (powyżej 60 mol%) znajdują się po przeciwnej stronie helisy, zatem molekuly AFGP mają charakter amfipatyczny.

Pozostałe znalezione u innych ryb białka krioprotekcyjne nie zawierają reszt sacharydowych (z wyjątkiem AFP II typu stynki, tab. 7). Wyróżnia się trzy rodzaje tych białek — AFP I, II i III typu.

AFP I typu. Są najbardziej rozpowszechnione u ryb (tab. 3) i prawdopodobnie występują też u pleśni śniegowych (np. psychromorbidyna, peptyd



Rys. 2. Konformacja AFP III typu z miętusa (za zgodą dra Zongchao Jia, University of Saskatchewan, Dept. Of Protein Crystallography).

o pI 9,5 i o masie 3,5 kDA, jest częściowo homologiczny z AFPI typu flądry północnoatlantyckiej) (24). Tworzą regularne cząsteczki o strukturze prawoskrętnej α -helisy. AFPI typu flądry północnoatlantyckiej to najkrótsze opisane w literaturze białka helikalne o długości ok. 5 nm (8,25,26) i o repetytywnej sekwencji, w której powtarza się bogaty w alaniny 11-peptyd: Thr X₂Asx X₇, gdzie X — to zwykle alanina (ponad 60 mol%). Podobnie jak AFGP są to białka amfipatyczne; po stronie hydrofilowej cząsteczki leżą reszty Thr, Asp i Asn, zaś po stronie hydrofobowej, wzmocnionej jednym lub dwoma mostkami solnymi, lokują się reszty Ala (rys. 1 b). W -1°C zawartość α -helisy w tego typu białkach przeciwlodowych stanowi co najmniej 85%, jednakże gwałtownie maleje w miarę wzrostu temperatury, i np. w 25°C wynosi już tylko 47%. Należy zaznaczyć, że trójwymiarowa struktura AFP I typu została ustalona rentgenograficznie, najpierw przy 4,5Å, później zaś uściślona przy rozdzielczości 1,5 Å (26).

AFP II typu są to prawdopodobnie białka globularne, bogate w cysteinę (8-10 mol%), zawierające 4 lub 5 mostków disulfidowych. Ich sekwencja została już ustalona, jednakże do tej pory nie udało się określić przestrzennego zwinięcia łańcucha polipeptydowego (28). AFP II typu u kruka morskigo są syntetyzowane w postaci 163-aminokwasowego prebiałka, którego dojrzewanie obejmuje usunięcie 34-aminokwasowego peptydu sygnałowego, odsłaniającego N-końców glutaminę (29). W przeprowadzonych badaniach przy użyciu dichroizmu kołowego wykazano, że AFP II typu nie zawierają odcinków helikalnych, natomiast są w nich obecne liczne zagięcia, być może o zdeformowanej strukturze β (28).

AFP III typu mają zrównoważony skład aminokwasowy (żaden aminokwas nie występuje w przewodzie), nie zawierają cysteiny i są zbudowane z 62-64 aminokwasów. Występują głównie u ryb rodziny *Zoarcidae*. Są to białka globularne, zawierające w cząsteczce 9 odcinków β -fałdowych, z których 6 jest uporządkowanych w strukturę typu β -sandwich (rys. 2) (31). Są produkowane w licznych wariantach, różniących się nieznacznie sekwencją (8,30-32). Mechanizm krioprotekcyjnego działania tej grupy THP został określony na poziomie molekularnym (31).

Deng i in. (1997) wyizolowali ostatnio z głowacza *Myoxycephalus octodecimspinosus* nowy, **IV typ AFP** ryb, oznaczony jako LS-12 (33). Składa się on ze 108 aminokwasów, zawiera aż 17% Gln, N-koniec ma zablokowany przez grupę piroglutamyłową. CD-widma wskazują na wysoką zawartość helisy, prawdopodobnie tworzącej poczwórną wiązkę (ang. *four-helix bundle*). Nie przypomina 3 innych typów AFP. Sekwencja AFP LS-12 jest podobna do sekwencji apolipoproteiny surowicy krwi, co świadczy o pokrewieństwie obu białek.

THP owadów są białkami heterogennymi, np. u *Tenebrio molitor* występuje 6 frakcji tych białek o masie 9-17 kDa (34). Larwy chrząszcza *Dendroides canadensis* i mszyc zawierają THP o masie 14,5 kDa (34). Nie są one glikozylowane, zawierają mniej alaniny (7-14 mol%) niż AFP I typu ryb, a więcej reszt hydrofilowych (40-61%) w porównaniu, np. z THP flądry (33%). THP *Tenebrio* i *Dendroides* są bogate w cysteinę (15 i 28 mol%). Inaktywuje je ditiotreitól (34). THP mszycy ma unikatową zawartość seryny — 30,5% (34).

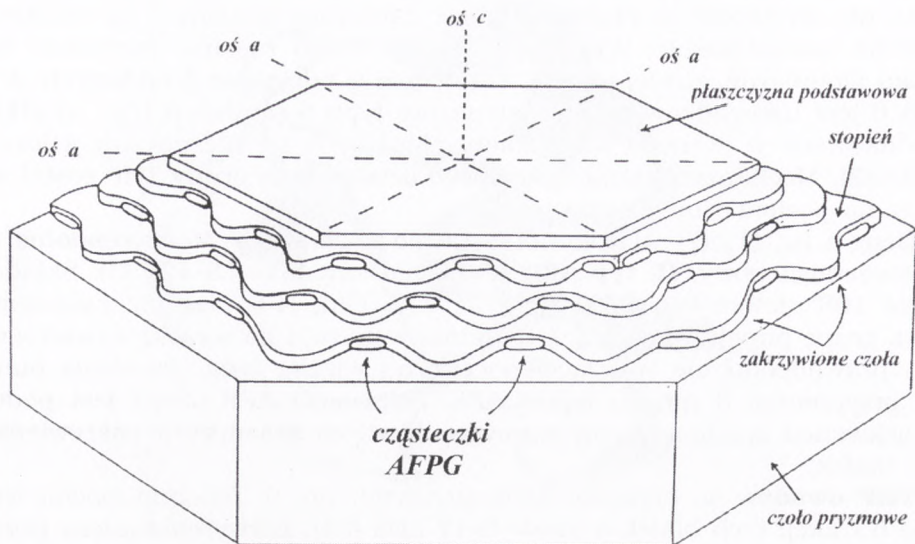
Z roślin wyizolowano dotąd 7 AFP:

- jedno białko o masie 67 kDa, zawierające 24% Gly, glikozylowane galaktozą, znalezione w słodkogorzu psiankowatym (35);
- sześć białek z liści zboża ozimego, *Secale cereale*, o masie z zakresu 15-38 kDa. Są to jednocześnie białka chroniące roślinę przed patogenami (ang. *pathogenesis related proteins* — PRP): dwa o aktywności endochitynazy, dwa będące endo- β -1,3-glukanazami i dwa białka taumatynopodobne (36,37).

Pseudomonas putida wydziela do podłoża AFP inaktywowany przez β -merkaptoetanol (15). Jest to obecnie prawdopodobnie jedyna informacja o naturze bakteryjnych białek przeciwlodowych.

4. Rola i mechanizm działania białek przeciwlodowych

Krioprotekcyjne działanie AFP jest trojaki. Białka te inhibują wzrost kryształków lodu, które przedostały się do ustroju, powodując, jak wspomniano, stan przechłodzenia organizmu. Drugą, równie ważną ich funkcją jest inhibicja rekrytalizacji lodu podczas rozmrażania płynów ustrojowych, natomiast u niektórych organizmów ich fizjologiczna rola polega na inhibicji tzw. białek nukleacyjnych lodu (*ice nucleating proteins* — INP), wytwarzanych przez te ustroje.



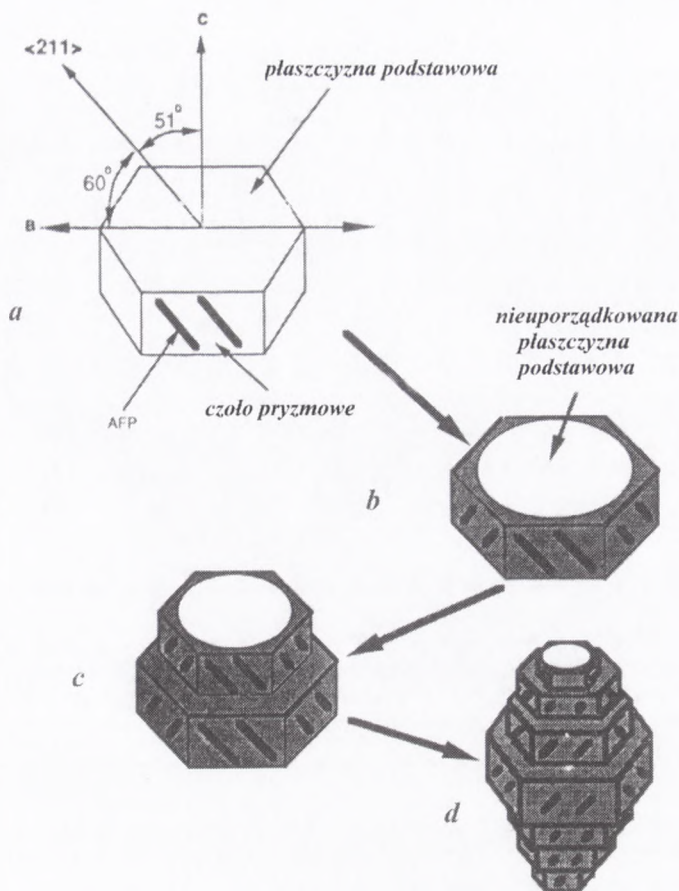
Rys. 3. Model ilustrujący hipotezę Raymonda-DeVriesa (38), tj. mechanizm wiązania się AFPG z siateczką lodu.

4.1. Inhibicja wzrostu kryształów lodu

W kilku różnych ośrodkach wykazano, że istotą tej funkcji THP jest adsorpcja ich cząsteczek na zarodkach kryształów lodu, które wniknęły do wnętrza ustroju, bądź utworzyły się w nim spontanicznie (7-9,25). Wynikiem adsorpcji białek przeciwlodowych na kryształach lodu jest zawsze zmiana pokroju (habit) kryształu z heksagonalnego poprzez bipiramidalny na igiełkowaty, wynikająca ze zmiany kierunku wzrostu kryształu z: wzdłuż osi *a*, na: wzdłuż osi *c* (rys. 5), obserwowana oczywiście przy spadku temperatury poniżej obniżonego już przez AFP punktu krzepnięcia wody.

Do tej pory skonstruowano trzy modele, tłumaczące mechanizm inhibicji wzrostu kryształów lodu przez białka termicznej histerezy.

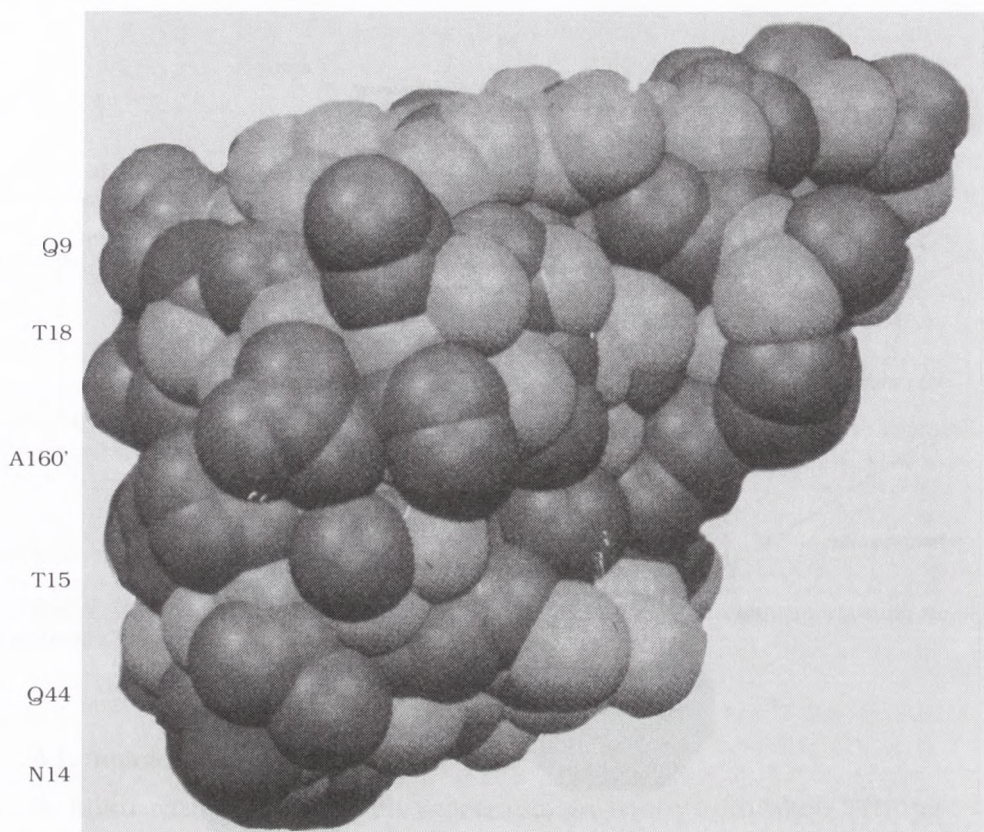
1. Model Raymonda i DeVriesa z początku lat osiemdziesiątych (38), zakładający strukturalną komplementarność helikalnych cząsteczek AFPG nototeni antarktycznych z siateczką lodu, dzięki czemu możliwe jest tworzenie sieci wiązań wodorowych między hydrofilową stroną helisy (reszty sacharydowe) białka krioprotekcyjnego a atomami tlenu cząsteczek wody ulokowanych na pryzmowych czolach kryształu lodu, co w efekcie prowadzi do ekspozycji hydrofobowych reszt aminokwasów amfipatycznej molekuly krioprotektora w kierunku rozpuszczalnika i przeciwdziała wiązaniu przez kryształ kolejnych cząsteczek wody. Zaadsorbowane na pryzmowych ściankach kryształu lodu cząsteczki AFPG dzielą je na wiele sekcji i wymuszają wzrost kryształu w obszarach znajdujących się między nimi, co prowadzi do wy-



Rys. 4. Model ilustrujący hipotezę Yanga i in. (25) mechanizmu działania AFP I typu (wg 8); (a) AFP wiążą się preferencyjnie na czołach pryzmowych, równoległe do wektora $\langle 211 \rangle$; (b) związane AFP wymuszą uporządkowanie dipoli wody (obszar zacieniony); (c) wzrost kryształu może się odbywać tylko w płaszczyźnie podstawowej (nieuporządkowane dipole wody — obszar jasny); (d) kolejne stopniowe obniżenie temperatury prowadzi do powstania bipiramidalnego kryształu.

tworzenia płaszczyzn o dużej krzywiznie (rys. 3) i o tak wysokiej swobodnej energii, że po przekroczeniu pewnej krytycznej wartości stosunku powierzchni obszarów krzywizn do ich objętości następuje zahamowanie wzrostu kryształu wzdłuż osi a (efekt Gibbsa-Thomsona) (6,8). Jeśli dalej będzie się obniżać temperaturę, wzrost kryształu jest możliwy jedynie wzdłuż osi c, prostopadłej do płaszczyzny podstawowej (rys. 3), co powoduje zmianę kształtu kryształu. Model Raymonda i DeVriesa ma charakter statyczny.

2. Model Yanga i in. z 1988 r. (25), wyjaśniający mechanizm działania AFP I typu, zakłada indukujący wpływ dipolowych z natury, helikalnych

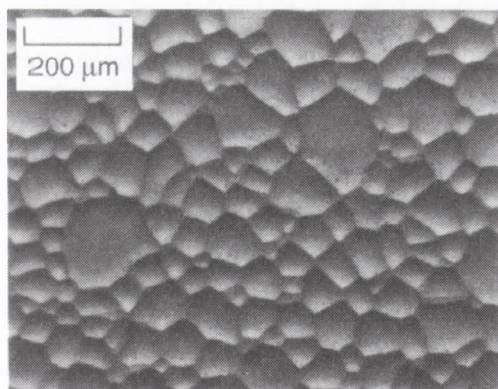


Rys. 5. Struktura miejsca wiążącego AFP III typu (wg 26).

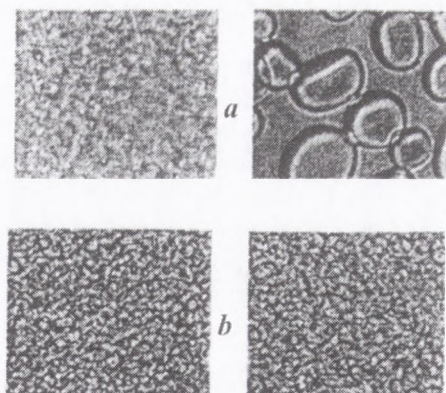
cząsteczek tych białek na określone uporządkowanie dipoli wody w siateczce czół pryzmowych kryształu lodu (rys. 4), spowodowane adsorpcją cząsteczek AFP, dzięki tworzeniu się wiązań wodorowych z cząsteczkami wody w siateczce lodu. W tym przypadku jest to model o charakterze dynamicznym, uwzględniający również istotne znaczenie amfipatyczności helis AFP I typu.

3. Model Daviesa i in. z 1996 r. (31). Również w tym modelu, tłumaczącym mechanizm oddziaływań AFP III typu (białko globularne bez repetytywnych sekwencji) z lodem, istotną dla adsorpcji tej cząsteczki rolę odgrywa amfipatyczność miejsca wiążącego tego białka. Wykazano, że pięć reszt tego miejsca (Gln9, Asn14, Thr15, Thr18 i Gln 44) tworzy 5 wiązań wodorowych z siateczką lodu płaszczyzny pryzmowej, zaś reszty apolarne oddziałują z płaszczyzną podstawową kryształu, blokując jego wzrost. Strukturę miejsca wiążącego AFP III typu przedstawiono na rysunku 5.

Mechanizm działania AFP II typu ryb oraz białek przeciwlodowych owadów, roślin i drobnoustrojów jest dotąd nie znany. Pierwotną funkcję THP (inhibicja wzrostu kryształów lodu) wspomagają u wielu owadów poliole (glicerol, sorbitol, mannitol) sezonowo wytwarzane w stężeniach nawet kilku-



Rys. 6. Rekrystalizacja lodu podczas rozmrażania ultracienkiej płytki lodu wymrożonej z czystej wody (wg 39).



Rys. 7. Mikrofotografie kryształów lodu, obrazujące inhibicję rekrystalizacji lodu przez AFP. Zdjęcia lewe obrazują stan początkowy wymrożonych płytek lodu, zdjęcia prawe — obraz po 60 min: (a) obraz kontrolnej płytki lodu (wymrożona płytka z cieczy po hodowli dzikiego szczepu *S. cerevisiae* nie produkującego AFP); (b) obraz płytki lodu wymrożonej z cieczy po hodowli rekombinowanego szczepu *S. cerevisiae* pUR 2682, z wprowadzonym genem AFP III typu (wg 50).

molowych (14). Powodują one jednak drastyczny wzrost ciśnienia osmotycznego, co jest szczególnie niebezpieczne w okresie powrotu owada do aktywności. Dlatego też przypuszcza się, że funkcją wtórną białek przeciwlodowych owadów może być wspomaganie bilansu wodnego, czyli udział w minimalizacji skutków odwodnienia (34), a także, że mogą one być wykorzystywane jako białka zapasowe, szczególnie przy braku pokarmu w końcu sezonu zimowego, gdy owad staje się aktywny (14).

4.2. Inhibicja rekrystalizacji lodu

Przez rekrystalizację lodu rozumie się wzrost dużych kryształów lodu kosztem energii wydzielającej się podczas topnienia małych kryształów, obserwowany w trakcie rozmrażania materiału w wyniku tworzenia się lokalnych gradientów temperatury. Zjawisko rekrystalizacji zachodzi w temperaturach nieco wyższych od punktów krzepnięcia roztworów wodnych, ponadto towarzyszy ogrzewaniu przechłodzonych tkanek. Mechanizm hamowania rekrystalizacji lodu przez THP nie jest całkowicie jasny. Według hipotezy Knighta i in. (39,40) hamują one migrację krawędzi ziaren lodu, wiążąc się z nimi w obszarach granicznych kryształu. Wymaga to strukturalnego dopasowania się cząsteczki AFP do krawędzi ziarna lodu, a zatem białka te musi charakteryzować znaczna elastyczność. Zjawisko wzrostu kryształów lodu podczas rekrystalizacji zamrożonych wodnych roztworów przedstawiono na rysunkach 6 i 7.

4.3. Inhibicja nukleacji lodu

W tolerujących zamarzanie organizmach, np. w owadach, występują INP, działające jako zarodki kryształów lodu, prawdopodobnie dzięki strukturalnemu podobieństwu do powierzchni tych kryształów. Powodują one powstawanie lodu w przestrzeniach międzykomórkowych, chroniąc tym samym wewnątrzkomórkową wodę przed zamarznięciem. AFP mogą je w odpowiednim momencie unieczynniać, oddziałując z nimi w ten sam sposób, jak z lodem. Co więcej, takie kompleksy przypuszczalnie hamują bardziej efektywnie wzrost już istniejących kryształów, niż pojedyncze cząsteczki AFP (34).

5. Biotechnologicznie istotne kierunki badań nad białkami termicznej histerezy

Właściwości chemiczne i fizjologiczne funkcje białek przeciwlodowych, omówione w poprzednich rozdziałach wskazują, że mogą one znaleźć wiele zastosowań w praktyce gospodarczej (rolnictwo, przemysł spożywczy) oraz w medycynie (krioprotekcja komórek, tkanek, organów).

Badania nad komercjalizacją AFP są zaawansowane i prowadzone w wielu ośrodkach w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie i Europie Zachodniej. Obejmują one poszukiwania dróg i warunków wykorzystania tych krioprotektantów, a także zmierzają do otrzymania rekombinowanych drobnoustrojów, wydajnie produkujących THP, do konstrukcji transgenicznych roślin i zwierząt oraz do poznania interakcji AFP z różnego typu receptorami błon biologicznych.

5.1. Synteza AFP przez rekombinowane drobnoustroje

Konstrukcja szczepów wydajnie produkujących THP ma istotne znaczenie, ponieważ obecnie 1g AFP, izolowany np. z 250 ml surowicy krwi nowofundlandzkiego dorsza kosztuje 5000-7000 USD (41). Szczególnie obiecujące są następujące wyniki:

- uzyskano ekspresję genu AFP6 typu I z flądry północnoatlantyckiej (α -helikalny 37-aminokwasowy peptyd) w *E. coli* w formie wewnątrzkomórkowego fuzyjnego białka z β -galaktozydazą lub białkiem A stafilokoków (42-44);
- stransformowany genem AFP III z miętusa, o zmodyfikowanej sekwencji kodującej N-koniec białka, szczep *E. coli* wydajnie produkował białko fuzyjne. AFP wydłużony o Met-Lys od strony N-terminalnej zachował pełną aktywność krioprotekcyjną (45);
- z użyciem plazmidów pUC i pET uzyskano w *E. coli* ekspresję genu THP z pszenicy *Triticum aestivum*. Białko zachowało aktywność krioprotekcyjną (46);
- gen AFP8 I typu z flądry północnoatlantyckiej poddano przypadkowej mutacji, uzyskując następnie ekspresję czterech tandemowych powtó-

- rzeń zmutowanego genu w *E. coli*. 4 klon transformowanych bakterii wykazywały podwyższoną przeżywalność w -20°C i wyższą osmotolerancję. Muteina AFP zachowała amfipatyczność struktury (47);
- w *E. coli* uzyskano ekspresję genu cor 15, pochodzącego z *Arabidopsis thaliana* aklimatyzowanej do zimna. Produkt ekspresji — 15-amino-kwasowy peptyd COR15 zachował aktywność krioprotekcyjną (48);
 - z użyciem plazmidów pUR uzyskano ekspresję genu AFP6 I typu z flądry i z głowacza w drożdżach *S. cerevisiae* SU 10. Produkt ekspresji — białko fuzyjne AFP z α -galaktozydazą lub drożdżowym czynnikiem koniugacyjnym α ulegał sekrecji dzięki sygnałowej sekwencji β -fruktofuranozydazy. Ponieważ proteolityczne dojrzewanie było niekompletne, otrzymywano heterologiczną mieszaninę dojrzałego AFP, nośnika i białka chimerycznego. Wydajność ekspresji wyniosła 10 mg/ml (49,50);
 - w drożdżach *S. cerevisiae* uzyskano ekspresję AFP III typu z *Macrozoarces americanus* o 2-krotnie wyższej aktywności krioprotekcyjnej. Białko było wydzielane do podłoża, a transformowane drożdże wykazywały 2,5% przeżywalność w -196°C (51);
 - od kilku lat są prowadzone próby transformacji *Lactobacillus* sp. genem AFP z *Pseudomonas putida*. *Pseudomonas putida* cechuje się wysoką przeżywalnością w temperaturze od -20 do -50°C (52,53).

5.2. Konstrukcja transgeniczných zwierząt i roślin odporných na niską temperaturę

Pierwsze prace przeprowadzone nad otrzymaniem transgenicznego łosia *Salmo salar* z wprowadzonym genem AFP I typu flądry zimowej *Pseudopleuronectes americanus* nie były zbyt zachęcające, ponieważ poziom ekspresji THP okazał się zbyt niski dla efektywnej krioprotekcji ryby (54). W kolejnych eksperymentach Hew i Fletcher (41) wprowadzili do jaj łosia gen AFP I połączony z genem hormonu wzrostu tej ryby. W efekcie transgeniczny łosć rósł sześciokrotnie szybciej od ryb kontrolnych i mógł bytować w wodach szelfu kanadyjskiego.

Otrzymano też transgeniczne karpie, pstrągi i łosie, wprowadzając do komórek jajowych tych ryb gen AFP III typu z miętusa *Macrozoarces americanus*. Te transgeniczne ryby charakteryzowała wyższa przeżywalność w niskich temperaturach i wyższa masa ciała (55).

Stosując plazmid pBlueBac wprowadzono do hodowli komórek *Spodoptera frugiperda* (owad) gen AFP II typu bogatego w cysteinę z kruka morskiego z odpowiednią sekwencją sygnałową. Produkowane białko zachowało natywne ułożenie mostków disulfidowych. Wydłużenie N-końca cząsteczki nie obniżyło jego krioprotekcyjnej aktywności (56).

Uzyskano ekspresję genu AFP III typu z wilka morskiego w samicach *Drosophila melanogaster*. Poziom AFP w hemolimfie owada osiągnął 50 mg/ml. Plazmid z genem AFP został wprowadzony do zarodków muszki poprzez mikroiniekcję. Uzyskano także transgeniczną *Drosophila melanogaster*, zawierającą gen AFP II typu bogatego w cysteinę. W tym przypadku nie stwier-

dzono jednak w transgenicznym osobniku zwiększonej tolerancji na zimno (58). Ekspresja w *Drosophila melanogaster* genu AFP III typu z miętusa, zmodyfikowanego dodaniem 7-aminokwasowej sekwencji przy N-końcu, dała natomiast białko o pełnej aktywności krioprotekcyjnej względem natywnego odpowiednika (59).

Pierwszą stransformowaną THP rośliną był pomidor, w którego liściach uzyskano ekspresję genu AFP I typu z flądry w postaci białka fuzyjnego, natomiast nie stwierdzono ekspresji genu w owocach. Poziom AFP w liściach był wystarczający dla inhibicji rekrytalizacji lodu (60).

5.3. Badanie zależności struktura/funkcja THP owadów, roślin i drobnoustrojów

Wspomniano już, że struktura żadnego z AFP tych grup organizmów nie została dotąd ustalona, głównie ze względu na trudności z ich izolacją (małe ilości hemolimfy u owadów, itp.) (9).

Ostatnio Easton i Horwath (61) opracowali metodę długookresowej hodowli *in vitro* komórek ciał tłuszczowych larw chrząszcza *Tenebrio molitor*, z utrzymaniem ich morfologii i funkcji. Ponieważ komórki te *in vivo* u aklimatyzowanego do zimna owada wytwarzają białka przeciwlodowe, autorzy spodziewają się uzyskać materiał odpowiedni do izolacji tych białek, a także do badań indukcji ich biosyntezy.

5.4. Modyfikacje natywnych AFP metodami inżynierii białkowej

W grupie nielicznych, jak dotąd prac, mających na celu otrzymanie białek przeciwlodowych o zwiększonej aktywności krioprotekcyjnej mieszczą się np. takie zagadnienia jak:

- otrzymanie muteiny AFP III typu z miętusa o zredukowanej aktywności przeciwlodowej (mutacja kilku reszt w miejscu AFP wiążącym się z lodem), która nie hamowała wzrostu kryształów lodu, ale zmieniała ich morfologię (wydłużone heksagonalne bipiramidy) (62);
- porównanie struktury natywnego AFP i jego muteiny wykazało istnienie na poziomie molekularnym związków między krio- i osmotolerancją (47). Muteina AFP8 I typu z flądry (przypadkowa mutacja) charakteryzowała się podwyższoną aktywnością histerezową, a ponadto nadawała transformowanym drobnoustrojom zdolność tolerancji wysokich stężeń NaCl (osmotolerancja).

Można przypuszczać, że lepsze poznanie, np. na poziomie atomowym, mechanizmów oddziaływania THP różnego pochodzenia z siateczką kryształu lodu umożliwi w przyszłości zaprojektowanie za pomocą grafiki molekularnej „idealnego” krioprotekcyjnego białka i jego wykorzystanie do produkcji na większą skalę przez zrekombinowane drobnoustroje, a także do otrzymywania transgenicznych, tolerujących zamarzanie roślin uprawnych i drzew owocowych oraz odpornych na zamrażanie owoców i warzyw.

5.5. Badania nad wykorzystaniem AFP w rolnictwie, przemyśle spożywczym i krioochronie materiałów biologicznych

5.5.1. Rolnictwo i przemysł spożywczy

Najistotniejsze kierunki aplikacji białek przeciwlodowych w tych obszarach są następujące (9):

- ochrona plonów poprzez wprowadzenie do upraw polowych transgenicznych roślin o zwiększonej tolerancji na zamrażanie (63);
- ochrona integralności tkanek i komórek w mrożonej żywności (truskawki, maliny, pomidory, niektóre gatunki mięsa) przez egzogenne AFP, wprowadzone na drodze infiltracji próżniowej, mikroiniekcji, moczenia, iniekcji przedubojowej, itp. (64);
- redukcja wzrostu drobnoustrojów, zwłaszcza podczas rozmrażania żywności. Powinno się tu wykorzystać egzogenne AFP, co pozwoliłoby na szybkie rozmrażanie produktu. W materiale roślinnym jest możliwa indukcja endogennych PR-białek (ang. *patogenesis related proteins*: endoglukanazy, endochitynazy i białka taumatynopodobne), niszczących mikroflorę i wykazujących równocześnie właściwości krioprotekcyjne (65);
- ochrona typowej tekstury niektórych mrożonych produktów, np. „gładkości” lodów przez egzogenne białka przeciwlodowe (9);
- wykorzystanie zrekombinowanych drożdży o podwyższonej kriotolerancji w produkcji mrożonych ciast (9);
- produkcja mrożonych jogurtów z kriotolerancyjnymi bifidobakteriami *Lactobacillus* (9).

5.5.2. Krioochrona materiałów biologicznych (komórek, tkanek, organów, enzymów)

Największy rynek dla białek przeciwlodowych jest związany z ich ewentualnym wykorzystaniem w medycynie i pokrewnych dziedzinach, a zwłaszcza w przechowywaniu elementów morfotycznych krwi, krioochronie komórek jajowych człowieka, dotąd nie osiągalnej, a także w magazynowaniu w stanie zamrożonym organów przeznaczonych do transplantacji (41).

Do najistotniejszych wyników w przeprowadzonych w tym obszarze badaniach należą:

- komórki pobrane zimą z jelita środkowego wija *Lithobius farticatus*, aklimatyzowanego do temperatury $-8,2^{\circ}\text{C}$ przenoszono po inkubacji z THP (20 $\mu\text{m}/\text{ml}$), wyizolowanego z chrząszcza *Dendroides canadensis*, do temperatury $-15,1^{\circ}\text{C}$. Zaobserwowano 50% zwiększenie przeżywalności komórek w $-15,1^{\circ}\text{C}$ względem kontroli bez THP. Cząsteczki AFP gromadziły się głównie na membranach komórek jelitowych, ale znajdowano je również wewnątrz komórek (66,67);
- oocyty świni, zamrożone w roztworze każdego z czterech typów AFP ryb (20 mg/ml) w 75% przeżywały zamrożenie. Przeżywalność w nieobecności AFP była śladowa (68);

- plemniki owcy po zamrożeniu w roztworze AFP I typu lub AFGP (0,1-10 $\mu\text{g/ml}$) wykazywały większą ruchliwość od próby kontrolnej. Wyższe stężenia były mniej efektywne (69);
- wątroby ssaków, zamrażane w roztworze AFGP (1 mg/ml) i glicerolu (0,5 M), po cyklu mrożenia produkowały 2-5-krotnie więcej żółci od organów zamrażanych bez AFGP (70);
- AFP I typu (40 $\mu\text{g/ml}$) redukował hemolizę erytrocytów podczas powolnego rozmrażania ich zawiesin w hydroksyetyloskrobi (71). Również AFP II i III typu powodowały w tych samych warunkach zmniejszenie hemolizy o 75-80%. Kontrola kriomikroskopowa wykazała inhibicję rekrytalizacji lodu przez AFP (59);
- AFP I typu flądry (0,5 mg/ml) inhibowały transport Ca^{2+} i K^{+} w granulocytach wieprzowych (72). Pasywny transport Ca^{2+} był też hamowany w komórkach ciemieniowych królika przez AFP III typu (1 mg/ml), znakowany fluorescencyjnie (73);
- liposomy traciły po zamrożeniu 60% zawartości; AFGP (1 mg/ml) blokowały to zjawisko, stabilizując płynność dwuwarstwy lipidowej (74);
- AFP I typu i hydroksypropylo- β -cyklodekstryny chroniły dehydrogenazę mleczanową z mięśni królika (tetrameryczne białko) przed dysocjacją podczas zamrażania-rozmrażania i liofilizacji (75).

Nie wszystkie wyniki badań nad kriochroną tkanek i komórek dały oczekiwane wyniki. W wielu eksperymentach obserwowano szkodliwe działanie tych białek, m.in.

- wykazano, że AFP III typu i AFGP (1 mg/ml) zwiększały nieszczelność błon tylakoidów liści szpinaku w 0°C (76);
- AFP I typu w niskich stężeniach (od 0,1 do 1 $\mu\text{g/ml}$) okazał się lekko cytotoksyczny dla plemników owiec w 5°C (69);
- AFP w stężeniach milimolowych, dodawane do zawiesiny erytrocytów w hydroksyetyloskrobi zwiększały (względem próby kontrolnej) stopień ich hemolizy podczas rozmrażania prób (77);
- serca szczurze przepłukane roztworem AFGP i zamrożone na kilka godzin w $-1,4^{\circ}\text{C}$ wykazywały większe uszkodzenia aniżeli organy kontrolne. Ich zasięg zależał od stężenia AFGP: serca traktowane AFGP o stężeniu 10 mg/ml nie były po rozmrożeniu. Przy stężeniu 5 mg/ml uszkodzenia były mniejsze — serca były nierytmicznie. Nawet w niewielkim stężeniu (10 $\mu\text{g/ml}$) AFGP powodowały obniżenie wydajności pracy serca w porównaniu z niezamrażaną kontrolą (78);
- część kardiomiocytów, zamrożonych w -4°C w roztworze AFGP (0,5 mg/ml) ulegała po rozmrożeniu spontanicznemu obkurczeniu, prowadzącemu do śmierci komórek. Obserwacje kriomikroskopowe zamrożonych preparatów wykazały obecność „drzewiastego” lodu. Przy wzroście stężenia AFGP do 10 mg/ml, w trakcie zamrażania powstawał igłopodobny lód, uszkadzający znaczną część komórek, które ulegały lizie podczas rozmrażania preparatów (79);
- dodatek AFP (w stężeniu powyżej 100 mg/ml) do komórek ludzkiej białaczki KG-1,7 zmniejszał ich przeżywalność podczas zamrażania (80).

Autorzy przytoczonych badań wskazują, że interakcje białek przeciwlodowych z różnego typu komórkami są różne i zależą nie tylko od rodzaju użytego AFP, ale także od jego stężenia. Ponieważ badania molekularnej istoty oddziaływań THP z błonami biologicznymi są rozwijane od niedawna, można przypuszczać, że do szerszego wykorzystania tych białek w kriochronie systemów biologicznych wiedzy jeszcze długa droga.

6. Podsumowanie

Białka termicznej histerezy, odkryte przed prawie trzydziestoma laty, stanowią w dalszym ciągu fascynujący obiekt badań. Wynika to przede wszystkim z możliwości ich wykorzystania w krioprotekcji żywności, w hodowli odpornych na zimno, a nawet na zamarzanie, transgenicznych roślin uprawnych i ryb, a także z przewidywanej użyteczności białek przeciwlodowych w przechowywaniu materiału biologicznego w stanie zamrożonym przed jego wykorzystaniem w terapii medycznej. Komercjalizacja produkcji THP wymaga jednakże przeprowadzania dalszych badań, zarówno nad nowymi ich rodzajami, jak i — może nawet przede wszystkim — nad istotą ich oddziaływań nie tylko z kryształami lodu, ale również z błonami biologicznymi różnego typu komórek.

Literatura

1. Murray R. K., Granner D. J. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., (1994), *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa, 27-28.
2. Hochachka P. W., Somero G. N., (1978), *Strategie adaptacji biochemicznych*, PWN, Warszawa, 275.
3. Carey C., Florant G. L., Wunder B. A., Horowitz B., (1993), *Life in the cold. Ecological, Physiological and Molecular Mechanisms*, Westview Press, Boulder, San Francisco, Oxford.
4. Storey K. B., Storey J. M., (1998), *Physiol. Rev.*, 68, 27-84.
5. DeVries A. L., Komatsu S. K., Feeney R., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 2901-2908.
6. DeVries A. L., (1988), *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B, 611-621.
7. DeVries A. L., (1986), *Cryprotective glycopeptides and proteins: interaction with ice and water*, in: *Meth. Enzymology*, 127, 293-303, Academic Press, London, N.Y.
8. Davies P. L., Hew Ch. L., (1990), *FASEB J.*, 4, 2460-2467.
9. Griffith M., Ewart K. V., (1995), *Biotechnol. Adv.*, 13, 375-402.
10. Duman J., Horwath K., (1983), *Ann. Rev. Physiol.*, 45, 261-270.
11. Theede H. R., Schneppenheim R. B., (1976), *Marine Biol.*, 36, 183-189.
12. DeVries A. L., Wohlschlag D. E., (1969), *Science*, 163, 1073-1075.
13. Horwath K. D., Duman J. G., (1983), *J. Comp. Physiol.*, 151, 233-240.
14. Urrutia M. F., Duman J. G., Knight Ch. A., (1992), *Biochim. Biophys. Acta*, 1121, 199-206.
15. Duman J. G., Olsen T. M., (1993), *Cryobiology*, 30, 322-328.
16. Raymond J. A., Sullivan C. W., DeVries A. L., (1994), *Polar Biol.*, 14, 71-75.
17. Wang X., DeVries A. L., Cheng Ch. H. C., (1995), *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 4, 135-147.
18. Hew Ch. L., Wang N. C., Joshi S., Fletcher R., Scott G. K., Hayes P. H. Buettner B., Davies P. L., (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 12049-12055.

19. Hsiao K., Cheng C. C., Fernandes I. E., Detrich H. W., DeVries A. L., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9265-9269.
20. Scott C. K., Hayes P. H., Fletcher G. L., Davies P. L., (1988), *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3670-3675.
21. Scott G. K., Hew C. L., Davies P. L., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2613-2617.
22. Wang X., DeVries A. L., Cheng C. C., (1995), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1247, 163-172.
23. DeVries A. L., (1971), *Science*, 172, 1152-1155.
24. Newsted W. J., Polvi S., Papis B., Kendall E., Saleem M., Hussain A., Cuterr A. J., Georges F., (1994), *Biochem. Cell Biol.*, 72, 152-156.
25. Yang D. S. C., Sax M., Chakkrabartty A., Hew C. L., (1988), *Nature*, 333, 233-237.
26. Sicheri F., Yang D. E. C., (1995), *Nature*, 375, 427-431.
27. Ng N. F., Trirh K. Y., Hew C. L., (1986), *J. Biol. Chem.*, 261, 5690-15695.
28. Ng N. F., Hew C. L., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 16069-16075.
29. Hayes P., Scott G. K., Ng N. F., Hew C., Davies P. L., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 18761-18767.
30. Schrang J. D., Cheng C. H., Panico N. M., Marris H. R., DeVries A. L., (1987), *Biochim. Biophys. Acta*, 915, 357-370.
31. Zonghao J., DeLuca C. J., Chao H., Davies P. L., (1996), *Nature*, 384, 285-288.
32. Zonghao J., DeLuca C. I., Davies P. L., (1995), *Protein Science*, 4, 1236-1238.
33. Deng G., Andrews D. W., (1997), *FEBS Lett.*, 402, 17-20.
34. Duman J. G., Wu D. W., Olsen T. M., Urrutia M., Tursman D., (1993), *Adv. Low-Temp. Biol.*, 2, 131-182.
35. Duman J. G., (1994), *Biochim. Biophys. Acta*, 1206, 129-135.
36. Hon W. C., Griffith M., Chong P., Yang D. S. C., (1994), *Plant Physiol.*, 104, 971-980.
37. Hon W. C., Griffith M., Mlynarz Z. M., Zhang J., Yang D. S. C., (1994), 4th Int. Congr. Plant. Mol. Biol., Abstr. 10-6.
38. Raymond J. A., DeVries A. L., (1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2589-2593.
39. Knight C. A., Wen D., Laursen R. A., (1995), *Cryobiology*, 32, 23-34.
40. Knight C. A., Duman J. G., (1986), *Cryobiology*, 23, 256-262.
41. Hardtman T., (1998), Fisch antifreeze proteins have unexpected applications, <http://www.mun.ca/research/matters/june96/antifrez.html>
42. Peters T. D., Mac Gregor T. M., Walker V. K., Davies P. L., (1989), *J. Cell. Biochem.*, 13B, 183-187.
43. Muller G. M., McKown R. L., Corotto L. V., Hague C., Warren G. J., (1991), *J. Biol. Chem.*, 266, 7339-7344.
44. Warren G. J., Hague C. M., Corotto L. V., Mueller G. M., (1993), *FEBS Letters*, 321, 116-120.
45. Li X., Hew C. L., (1991), *Protein Engng.*, 4, 996-1002.
46. Sarhan F., Honde M., Laliberte J. F., (1995), *Pat. No CA 2104142*.
47. Meijer P. J., Holmerg N., Grundstrom G., Bulow L., (1996), *Protein Engng.*, 5, 1051-1054.
48. Thomashow M. F., (1994), *US Pat. No 5, 356, 816*.
49. Toshka H., Verbakel J. M., Almkerk J., (1994), *Pat. No WO94/03617*.
50. Driedonks R. A., Toschka H. Y., van Almerk J. W., Schäffers I. M., Verbakel J. M. A., (1995), *Yeast*, 11, 949-864.
51. Chapman J. W., Musters W., van Waasenaar P. D., (1997), *Pat. No WO97/02343*.
52. Sun X. M., Griffith M., Pasternak J. J., Glick B. R., (1995), *Can. J. Microbiol.*, 41, 776-784.
53. Griffith M., Ala P., Yang D. S. C., Hon W. C., Moffatt B. A., (1992), *Plant. Physiol.*, 100, 593-596.
54. Hew C. L., Davies P. L., Fletcher G. L., (1991), *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1, 309-317.
55. Cowan D. A., (1997), *Trends in Biotechnol.*, 15, 129-131.
56. Duncker B. P., Gjamtier S. Y., Davies P. L., (1994), *Biochem. Biophysic. Res. Commun.*, 203, 1851-1857.
57. Peters I. D., Mac Gregor T. M., Walker V. K., Davies P. L., (1989), *J. Cell. Biochem.*, 13B, 183-195.

58. Duncker B. P., Hermans J. A., Davies P. L., Walker V. K., (1996), *Transgenic Res.*, 5, 49-55.
59. Li X., Hew C. L., (1991), *Protein Engng.*, 4, 996-1002.
60. Hightower R., Baden E., Lund P., Dunsmuir P., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17, 1013-1021.
61. Easton Ch. M., Horwath K., (1998), *Comp. Biochem. Physiol.* (in press), (artykuł dostępny w internecie: www.DCBP1006.htm).
62. DeLuca C. J., Chao H., Sonnichsen F. D., Sykes B. D., Brian D., Davies, P. L., (1996), *Biophys. J.*, 71, 2346-2355.
63. Cutler A. J., Saleem M., Kendall E., Gusta L. V., Georges F., Fletcher G. L., (1989), *J. Plant. Physiol.*, 135, 351-354.
64. Payne S. R., Sandford D., Harris A., Young O. A., (1994), *Meat Sci.*, 37, 429-438.
65. Wilson C. L., El Ghaouth A., Chalutz E., Droby S., Steves C., Lu J. Y., Khan V., Arul J., (1994), *Plant Diseases*, 78, 837-843.
66. Tursman D., Duman J. G., (1995), *J. Exp. Zool.*, 272, 249-257.
67. Duman J. G., (1995), *Pat. No US 95-485559*.
68. Arrav A., Rubinsky B., Fletcher G. L., Seren E., (1993), *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 488-493.
69. Payne S. R., Oliver J. E., Upreti G. C., (1994), *Cryobiology*, 31, 180-184.
70. Rubinsky B., Araw A., Hong J. S., Lee C. Y., (1994), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200, 732-741.
71. Carperter J. F., Hansen T. N., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 89, 8593-8597.
72. Rubinsky B., Araw A., Mattioli M., Barboni B., Fletcher G. L., (1992), *Am. J. Physiol.*, 262, R542-R545.
73. Negulescu P. A., Rubinsky B., Fletcher G. L., Machen T. E., (1992), *Am. J. Physiol.*, 263, C1310-C1313.
74. Heyer L. M., Feeney R. E., Crow L. M., Crowe J. H., (1993), *Biophys. J.*, 64, 8296-8298.
75. Izutusu K., Yoshioka S., Terao T., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 43, 1102-1107.
76. Hinch D. K., DeVries A. L., Schmitt J. M., (1993), *Biochim. Biophys. Acta*, 1146, 258-264.
77. Chao H., Davies P. L., Carpenter J. E., (1996), *J. Exp. Biol.*, 199, 2071-2076.
78. Wang T., Zhu Q., Yang X., Layne J. R., DeVries A. L., (1994), *Cryobiology*, 31, 185-192.
79. Mungano J. A., Wang T., Layn J. R., DeVries A. L., Lee R. E., (1995), *Am. J. Physiol.*, 38, R4747-R479.
80. Hansen T. N., Smith K. M., Brockbank K. G. M., (1993), *Transplant. Proc.*, 25, 3192-3184.

Thermal hysteresis proteins — structure, function, application

Summary

The paper reports on distribution in nature, properties and molecular structure of antifreeze proteins, especially from fish (a continual biosynthesis) and from fish inhabiting northern part of moderate zone waters (a seasonal synthesis). Three main functions of THPs are described, i.e. inhibition of ice crystals growth, inhibition of ice recrystallization, and inhibition of ice nucleating proteins. Main approaches of THPs research, aimed at their commercialization, agricultural application (crop protection, transgenic plants and fish, resistant to low temperatures), food industry (including frozen foods) and medicine (cryoprotection of cells, tissues and organs for transplantations) are discussed. Cryotoxicity THPs detected by some researchers is also mentioned.

Key words:

thermal hysteresis proteins, antifreeze proteins.

Adres do korespondencji:

Marianna Turkiewicz, Instytut Biochemii Technicznej, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź; e-mail: mtur@ck-sg.p.lodz.pl