

Белки-нуклеаторы бактериального происхождения.

Сообщение II. Структура белков и их гены

Ice-Nucleating Proteins of Bacterial Origin.

Report II. Structure of Proteins and Their Genes

В обзоре проанализированы современные данные о нуклеаторах белковой природы бактерий и кодирующих их генах. Рассмотрены основные гипотезы и модели пространственной организации белков-нуклеаторов. Приведены сведения о природе и роли небелковых компонентов бактериальных нуклеаторов.

Ключевые слова: нуклеирующая активность, белки-нуклеаторы, гены белков-нуклеаторов, бактерии, кристаллизация.

В обзори проаналізовано сучасні дані щодо нуклеаторів білкової природи бактерій та генах, які їх кодують. Розглянуто основні гіпотези та моделі просторової організації білків-нуклеаторів. Наведено відомості про природу і роль небілкових компонентів бактеріальних нуклеаторів.

Ключові слова: нуклеююча активність, білки-нуклеатори, гени білків-нуклеаторів, бактерії, кристалізація.

The modern data on bacterial proteinaceous nucleators and their encoding genes are analyzed in the review. The main hypotheses and models of nucleating protein three-dimensional structure are discussed. The information on the nature and role of non-proteinaceous components of bacterial nucleators is presented.

Key words: nucleating activity, nucleating proteins, nucleating protein genes, bacteria, crystallization.

Устойчивые к замерзанию организмы в процессе эволюции выработали адаптационные механизмы, направленные на обеспечение выживания при образовании кристаллов льда. Лёдонуклеирующая активность является одним из средств защиты организма при замерзании. Бактерии, обладающие лёдонуклеирующей активностью, способны инициировать процесс ледообразования в воде при температурах выше -10°C [23]. Бактериальная нуклеация обусловлена наличием липогликопротеидных комплексов, которые служат матрицей для образования кристалла льда [10].

Гены белковых компонентов нуклеирующих структур были клонированы и секвенированы. Гены белков-нуклеаторов (БН) *Pseudomonas syringae* принято обозначать *inaZ* [32], *Pseudomonas fluorescens* – *inaW* [3], *Erwinia uredovora* – *inaU* [31], *Erwinia ananas* – *inaA* [1], *Pseudomonas borealis* – *inaPb* [43] и *Erwinia herbicola* – *inaE* [10]. Плазмиды, содержащие эти гены, превращают *Escherichia coli* в лёдонуклеирующую бактерию [10, 32]. Гены *inaE*, *inaA* и *inaW* обнаруживают 80, 76 и 75% гомологии с *inaZ* соответственно [1, 39, 40]. У гена *inaPb* также выявлено явное родство с другими генами БН [43]. ДНК *Pseudomonas antarctica* не гибридизуется с *inaZ* [28]. Предположительно ее БН имеет уникальную первичную структуру, которая может быть причи-

Freeze-resistant organisms have gotten adaptive mechanisms aimed at staying alive upon ice crystal formation in the evolutionary process. Ice nucleation activity is one of the means to protection of the organism from freezing. Ice-nucleating bacteria are able to nucleate ice formation in water at temperatures above -10°C [23]. Bacterial nucleation is attributed to lipoglycoprotein complexes that serve as a template for ice crystal formation [10].

Genes encoding proteinaceous components of nucleating structures were cloned and sequenced. Ice-nucleating protein (INP) genes from *Pseudomonas syringae* are referred as *inaZ* [32], *Pseudomonas fluorescens* as *inaW* [3], *Erwinia uredovora* as *inaU* [31], *Erwinia ananas* as *inaA* [1], *Pseudomonas borealis* as *inaPb* [43] and from *Erwinia herbicola* as *inaE* [10]. Plasmids containing these genes turn *Escherichia coli* into an ice-nucleating bacterium [10, 32]. The *inaE*, *inaA* and *inaW* genes demonstrated 80, 76 and 75% homology to the *inaZ* gene, respectively [1, 39, 40]. The *inaPb* gene was also revealed to be conspicuously similar to the other INP genes [43]. Genomic DNA from *Pseudomonas antarctica* did not hybridize with the *inaZ* gene [28]. Presumably INP from *P. antarctica* has a unique primary structure which can account for the difference between the cell-free ice-nucleating material from this bacterium and nucleators from other bacterial species [28].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

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

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

ной отличий внеклеточного нуклеирующего материала из этого вида бактерий от нуклеаторов из других видов бактерий [28].

Для продуктов этих генов характерны молекулярная масса 120–180 кДа и сходная первичная структура [12, 25]. Хотя, исходя из первичной последовательности гена *inaZ*, его продукт должен состоять из 1200 аминокислотных остатков и иметь молекулярную массу 120 кДа, в полиакриламидном геле (ПААГе) он мигрирует как белок с молекулярной массой 155 кДа [42]. Это возможно обусловлено посттрансляционной модификацией полипептида [20, 37], что вызывает особый интерес, так как небелковые компоненты нуклеирующих структур играют ключевую роль для проявления нуклеирующей активности. Другие авторы считают, что такое отличие молекулярных масс объясняется уникальным поведением данного полипептида в ПААГе [42]. Большая удельная доля серина, треонина и глицина в первичной последовательности может быть причиной аномально низкого сродства к додецилсульфату натрия. Кроме того, возможно, что форма этого белка значительно отличается от глобулярной и, следовательно, он не полностью денатурирован в условиях электрофореза. Продукт другого гена *inaW* имеет молекулярную массу 180 кДа [3]. Ген *inaU* кодирует белок, состоящий из 1034 аминокислотных остатков. Этот белок содержит фрагмент из 832 аминокислотных остатков с 52 повторами из высокомолекулярных мотивов по 16 аминокислотных остатков (R-домен), который фланкирован N- и C-концевыми последовательностями (N- и C-домены соответственно) [25, 31]. Анализ последовательности продукта гена *inaPb* показал, что он должен состоять из двух плоских доменов, расположенных напротив друг друга [43]. Один из доменов относительно гидрофобен и, вероятно, служит матрицей для формирования решетки кристалла льда, а другой может функционировать как комплементарная поверхность при белково-белковых взаимодействиях для образования агрегатов.

Посттрансляционная модификация полипептидов заключается в ковалентном присоединении липидных и углеводных компонентов. Прежде всего, этот вывод основывается на аналогии с "якорными" системами эукариотических клеток, где гидрофобные жирные кислоты фосфатидилинозитола встроены в клеточную мембрану, при этом инозитол связан с остатком глюкозамина, который, в свою очередь, связывается с маннаном, а последний прикрепляется к полипептиду через этаноламинный остаток [4, 22]. Тем не менее нуклеирующие структуры могут иметь иной состав, поскольку бактериальные "якорные" системы не идентичны эукариотическим. Например, этанол-

Products of these genes have molecular masses of 120–180 kDa and a similar primary structure [12, 25]. Although the *inaZ* gene specifies a structure containing 1,200 amino acid residues and a molecular mass of 120 kDa, the isolated protein had an apparent mass on polyacrylamide gel (PAGE) electrophoresis of about 155 kDa [42]. This can be due to posttranslational addition of other components [20, 37], which is of considerable importance, since non-proteinaceous components of nucleating structures appear to be critical in ice nucleation activity. Other authors suggest that this discrepancy in the molecular masses is accounted by a unique behaviour of this polypeptide in PAGE [42]. The large amounts of serine, threonine and glycine in the sequence may lead to an anomalously low affinity for SDS. Finally, this protein may be highly non-globular and not fully denaturated under the conditions of electrophoresis. The product of another gene, *inaW*, has a molecular mass of 180 kDa [3]. The *inaU* gene encodes a protein of 1,034 amino acid residues. This protein has an 832-amino acid residue segment consisting of 52 repeats of closely related 16-amino acid motifs (R-domain), flanked by N- and C-terminal sequences (N- and C-domains, respectively) [25, 31]. Sequence analysis of the protein encoded by the *inaPb* gene suggests that there are two opposite flat surfaces, one relatively hydrophobic that likely serves as an ice template, and the other that could function as a complementary face to facilitate inter-protein interactions for aggregate formation [43].

Posttranslational modification of polypeptides involves covalent attachment of lipid and carbohydrate components. Foremost, this conclusion is grounded on analogy to the anchoring system in eukaryotic cells, in which the hydrophobic fatty acids of phosphatidylinositol are imbedded in the cell membrane and the inositol is bound to a glucosamine residue, which in turn is linked to a complex mannan that in turn is linked to the protein *via* an ethanolamine residue [4, 22]. Nevertheless, nucleating structures can have a different composition, since the bacterial anchoring system is not identical to those on eukaryotic cells. For example, ethanolamine is not a metabolite as such in bacteria, although it can be formed from phosphatidylserine, and glucosamine cannot play the same role in bacterial cells as it does in eukaryotic ones [37]. The pathways of formation of the anchored structure also differ. In ice-nucleating bacteria the anchoring elements appear to be added sequentially to the protein, whereas in eukaryotic cells the anchoring system is built on phosphatidylinositol in the membrane and the protein is attached last. Phosphatidylinositol was proved to be a necessary component of class A nucleating agents. Phospholipase CII, a lipase which specifically hydrolyzes phosphatidylinositol to produce diacylglycerol and inositol trisphosphate [41], reduces the nucleation

амин не является метаболитом у бактерий, хотя он может производиться из фосфатидилсерина; глюкозамин также не может играть такую же роль в бактериальных клетках, что и у эукариот [37]. Пути формирования "якорных" систем также отличаются. У нуклеирующих лед бактерий элементы "якорной" системы, по-видимому, последовательно присоединяются к белку, тогда как у эукариот "якорная" система строится на фосфатидилинозитоле в мембране, а белок прикрепляется последним. Практически доказано, что фосфатидилинозитол является необходимым компонентом нуклеирующих агентов класса А. После обработки их фосфолипазой СII, которая специфично гидролизует фосфатидилинозитол с образованием диацилглицерола и инозитолтрифосфата [41], исчезает нуклеирующая активность [37]. Экспериментально установлено, что при добавлении в среду радиоактивного предшественника фосфатидилинозитола ^3H -инозитола, он включается в БН с молекулярной массой 210 кДа у *P. syringae* [37]. Кроме того, установлено, что добавление ионов Mn^{2+} , необходимого кофактора фосфатидилинозитолсинтазы, стимулирует образование нуклеирующих структур класса А у *P. syringae* в 7 раз. При этом на активность структур класса С ионы Mn^{2+} не влияли [20].

Можно считать доказанным присутствие маннана в составе структур класса А. После обработки их N- и O-гликаназами, предпочтительной мишенью которых являются гликопротеиды, содержащие маннозу, исчезает нуклеирующая активность структур класса А [20]. Фосфолипаза СII также преимущественно разрушает маннансодержащие комплексы. Аналогичные результаты получены и при использовании α - и β -маннозидаз [19]. Применение радиоактивно меченной ^3H -маннозы подтвердило заключение о важности маннана для формирования нуклеирующих структур [37]. На примере *P. syringae* было продемонстрировано, что ^3H из маннозы ковалентно связан с белками с молекулярной массой 200 и 210 кДа, которые, как было доказано методом иммуноблоттинга, принадлежат к БН.

Вопрос присутствия глюкозамина в составе нуклеирующих структур и его роли в их функционировании остается открытым. Добавление глюкозамина в культуральную среду несколько увеличивает нуклеирующую активность, однако методом радиоавтографии с использованием ^3H -глюкозамина получен отрицательный результат, так как не было обнаружено включения этого вещества в полосы, соответствующие БН [37].

В белковой составляющей нуклеирующих агентов выделяют 3 домена:

1. Уникальный N-концевой домен (составляет ~15% от всей последовательности) является отно-

activity [37]. When a radiolabelled precursor of phosphatidylinositol, [^3H]inositol was added to the medium, it was incorporated in INP of 210 kDa in *P. syringae* [37]. Besides, the addition of Mn^{2+} , a required cofactor for the activity of phosphatidylinositol synthase, was found to greatly (sevenfold) stimulate the formation of class A nucleating structures in *P. syringae*. At the same time the formation of class C activity was unaffected [20].

The presence of mannan in class A structures is considered to be confirmed. N- and O-glycanase, both of which preferentially attack mannose-rich proteins, destruct class A activity [20]. Phospholipase CII also preferentially attacks mannan-containing complexes. Analogous results were also obtained after α - and β -mannosidase treatment [19]. Usage of radiolabelled [^3H]mannose confirmed the conclusion about the importance of mannan in nucleating structure formation [37]. As exemplified by the study of INP from *P. syringae* ^3H from mannose was covalently bound to proteins of 200 and 210 kDa and these labelled proteins belong to INPs, which was detected by immunoblotting.

The issue about the presence of glucosamine in nucleating structures and its role in their functioning remains open. The addition of glucosamine only slightly improves the ice nucleation activity, however radioautography with [^3H]glucosamine gave a negative result, showing no incorporation of the precursor into the bands corresponding INP [37].

3 domains are distinguished in the proteinaceous component of nucleating agents:

1. A unique N-terminal domain (~15% of total sequence) is relatively hydrophobic and contains the membrane anchor with mannan-phosphatidylinositol for the attachment of INP to the membrane. Despite all the known INPs are either located on the outer membrane or secreted into the culture medium, none of them has a signal sequence of 15 to 70 amino acid residues at the N-terminus, which pulls molecules through the membrane and is typical for other proteins transported through membranes to places of performing their functions [14]. Michigami *et al.* reported that after INP first assembled around the inner membrane, the assembly enters a vesicle just forming on the surface of the outer membrane and thus leaves the cell to be shed with its INP [24]. This process is ATP-dependent [17].

2. A unique C-terminal domain (~4% of total sequence) is very hydrophilic, as it is rich in basic residues. The carboxyl end is likely to extend into the medium. There is no evidence that this primary terminal structure is modified [19].

3. A central repeating R-domain (~80% of total sequence) is also hydrophilic and characterised by contiguous repeats of a consensus octapeptide Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr. The product of the

сительно гидрофобным и содержит "якорь", с помощью которого БН прикрепляется к мембране. К "якорю" присоединены маннан и фосфоинозитол. Несмотря на то, что все известные БН либо локализируются с внешней стороны мембраны, либо выделяются в культуральную среду, ни один из них не обладает сигнальной последовательностью в области N-концевого домена, длина которой обычно варьирует от 15 до 70 аминокислотных остатков, а ее функция заключается в транспорте молекулы через мембрану, что присуще другим белкам, проходящим через мембраны к "месту выполнения своих обязанностей" [14]. Michigami *et al.* установили, что после сборки БН с внутренней стороны мембраны комплекс входит в везикулу, формирующуюся в это время с внешней стороны, и таким образом покидает клетку [24]. Этот процесс является АТФ-зависимым [17].

2. Уникальный С-концевой домен (составляет ~4% от всей последовательности) сильно гидрофилен, так как богат основными остатками аминокислот. По-видимому, С-концевой домен выступает во внешнее пространство, и он не модифицирован [19].

3. Центральная R-домен (составляет ~80% от всей последовательности) также гидрофилен и характеризуется наличием непрерывных октапептидных повторов Ala-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Leu-Thr. Продукт гена *P. syringae* содержит 122 октапептидных повтора [10]. Делеционный анализ показал, что большая часть повторов не является необходимой для функционирования белка. Без полного исчезновения нуклеирующей активности может быть удалено до 68 повторов, хотя все делеции приводили к снижению нуклеирующей активности. Это указывает на то, что повторяющиеся пептидные звенья индивидуально влияют на процесс нуклеации, действуя как отдельные единицы матрицы для связывания молекул воды.

Очевидный кандидат на сайты связывания с сахарами (маннозой, глюкозамином или N-ацетилглюкозамином, и, возможно, галактозой и галактозамином) это область повторов. Существует расхождение в молекулярных массах между кодируемым последовательностью ДНК белковым продуктом (120 кДа) и наблюдаемой при электрофорезе в ПААГе массой БН (170 кДа) из *P. syringae*. Принимая во внимание остатки одного серина и двух треонинов в каждом из 132 октапептидных повторов центрального домена, имеется 396 потенциальных сайтов связывания с ОН-группами, так что сайтов для присоединения как углеводов-мономеров, так и олигосахаридов вполне достаточно для объяснения избыточной массы белка. Инозитол в качестве компонента фосфатидилинозитола прикрепляется через маннанный комплекс, содержащий α - и β -связанные остатки маннозы (и, возможно, остаток

P. syringae gene comprises 122 octapeptide repeats [10]. Deletion analysis showed that most regions of the repeating structure were not essential for function. Up to 68 octapeptides could be deleted without abolishing ice nucleation, but all the deletion mutants showed reduced activity. This indicates that the repeated peptides contribute individually to the nucleation process, as expected if they act as individual units of a water-binding array.

The repetitive portion is the likely site for the addition of sugars, such as mannose, glucosamine or N-acetylglucosamine, and very possibly galactose and galactosamine. The molecular mass discrepancy from the DNA sequence to that on PAGE for *P. syringae* is 120 kDa *versus* the observed 170 kDa. Given one serine and two threonine residues for the 132 apparent repeating octapeptides of the central domain, there are about 396 potential OH-binding sites, so there are enough binding sites for single sugars as well as for oligosaccharides to add the additional mass. There is attachment of inositol of phosphatidylinositol *via* a mannan complex containing both α - and β -linked mannose residues (and possibly a glucosamine residue) to the highly conserved asparagine residues in positions 14, 15 and 43 on the N-terminal end [19]. Green *et al.* [9] showed that deletions from the amino terminus of the first 46 codons (or longer deletions), all of which deleted strictly conserved asparagine residues, abolished most of the class A and class B activities (down by about 1,000-fold). At the same time some class C activity was left in the mutants with the same deletions. On the other hand, the mutants containing deletions in the carbonyl-terminal region still had measurable class A and class B activities, although they were noticeably decreased as compared to the class C activity, which practically remained on the level typical for the wild type values. It should be pointed out that deletions and duplications disrupting the periodicity in the repetitive region significantly affected nucleating agents active at warm temperatures (class A). In contrast, when the periodicity was left intact, mutations in this region had only slight effects on nucleation activity. Herewith even large deletions in the non-repetitive amino-terminal domain did not abolish nucleation activity, but caused it to be limited to cooler threshold temperatures (class C activity). In contrast, deletions in the non-repetitive C-terminal domain were shown to considerably reduce ice nucleation activity at all temperatures. This attests to the necessity both of the amino- and carboxyl-terminal ends for maximum ice nucleation activity at the warmest temperatures.

Kozloff *et al.* [19] outlined a tentative path for the posttranslational modification of the product of the *inaZ* gene that suggests step-by-step conversion of the class C structures to class B and then to the most efficient class A structures (Fig. 1).

глюкозамина) к высоко консервативным аспарагиновым остаткам в положениях 14, 15 и 43 N-концевого домена [19]. Green *et al.* показали, что мутанты классов А и В, несущие делеции в области первых 46 кодонов (либо более длинные делеции) N-концевой последовательности, где и расположены все консервативные аспарагиновые остатки, имели в 1000 раз более низкую нуклеирующую активность [9]. При этом мутанты класса С с такими же делециями сохраняли некоторую нуклеирующую активность. С другой стороны, мутанты классов А и В, несущие делеции в области С-концевой последовательности, все же обладали невысокой нуклеирующей активностью. При этом мутанты класса С с делециями в С-концевой области сохраняли нуклеирующую активность практически на уровне значений, присущих дикому типу. Следует подчеркнуть, что делеции и дубликации, нарушающие периодичность повторяющегося мотива, особенно сильно влияли на нуклеирующие агенты, активные при высоких температурах нуклеации (класс А). Если же периодичность этой области сохранялась, то нуклеирующая активность снижалась незначительно. При этом делеции, локализованные в неповторяющейся области N-домена, влияют на нуклеацию при всех температурах и, хотя не приводят к полной потере нуклеирующей активности, все же сдвигают диапазон инициации образования кристаллов льда в область более низких температур (присущих классу С). В противоположность этому было установлено, что делеции в неповторяющейся области С-концевого домена существенно снижают нуклеирующую активность при всех температурах. Это свидетельствует о том, что все домены белкового компонента нуклеирующих структур необходимы для проявления максимальной нуклеирующей активности при самых высоких температурах.

Kozloff *et al.* [19] предложили гипотетический вариант посттрансляционной модификации продукта гена *inaZ*, который предполагает ступенчатое превращение структур класса С в класс В, а затем в наиболее эффективные структуры класса А (рис. 1).

Внеклеточный материал с лёдонуклеирующей активностью, экскретируемый *E. uredovora*, был выделен и очищен. Оказалось, что он представляет собой сферы диаметром 0,2–0,4 мкм, содержащие липидные, сахаридные, протеиновые и полиаминные компоненты [16]. Очищенный БН из внеклеточного нуклеирующего материала состоял из одной субъединицы с молекулярной массой 117 кДа [30]. Протеиновый компонент нуклеирующих агентов, по-видимому, обладает SH-группами, которые необходимы для проявления нуклеирующей активности [18]. Это предположение подтверж-

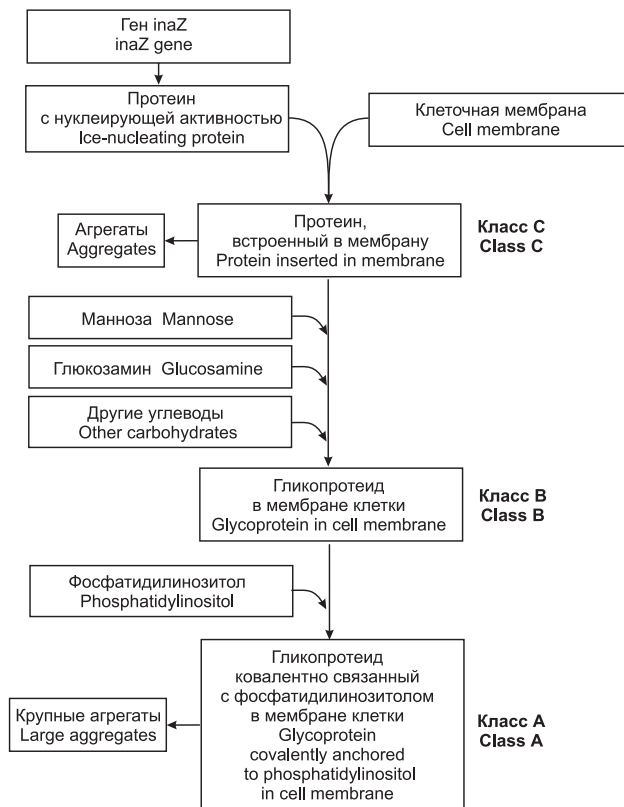


Рис. 1. Гипотетическое ступенчатое формирование лёдонуклеирующих структур.

Fig. 1. Hypothetical sequential formation of ice-nucleating structures.

The extracellular ice-nucleating matter produced by *E. uredovora* was isolated and purified. It was described as spheres with the diameter of 0.2–0.4 μm composed of lipid, saccharide, protein and polyamine components [16]. The purified INP from the extracellular matter was composed of one subunit of 117 kDa [30]. It is apparent that its protein component has SH-groups that are critical for ice nucleation activity [18]. This assumption was confirmed by the data that N-bromosuccinimide oxidizing tryptophan residues and p-mercuribenzoate blocking SH-groups are potent inhibitors of the ice nucleation activity [28, 30]. The polyamine took part in the surface charge, the control of hydrophobicity and the stability of protein conformation in the class A and B structures [15]. The extracellular nucleating agents isolated from the strain *P. antarctica* were different from those described earlier [28]. They were small spherical vesicles, 0.1 μm in diameter, and had a different chemical composition (Table).

As Table shows the main component of the extracellular nucleating matter from *P. antarctica* was lipid, whereas the main portion of the cell-free nucleating agents from *P. fluorescens* and *E. uredovora* was protein. SDS-PAGE showed that the lipoglycoprotein from *P. antarctica* migrated as a 190 kDa band.

дается тем, что N-бромсукцинимид, окисляющий остатки триптофана, и р-меркурибензоат, блокирующий SH-группы, являются мощными ингибиторами нуклеирующей активности [28, 30]. Полиамин необходим для создания поверхностного заряда, контроля гидрофобности и стабильности белкового компонента в структурах классов А и В [15]. Внеклеточные нуклеирующие агенты, выделенные из линии *P. antarctica*, отличаются по своим свойствам от описанных ранее [28]. Они представляют собой маленькие сферические везикулы диаметром 0,1 мкм и имеют другой химический состав (таблица).

Из таблицы видно, что основным компонентом внеклеточного нуклеирующего материала *P. antarctica* является липид, тогда как у *P. fluorescens* и *E. uredovora* – протеин. SDS-электрофорез показал, что липогликопротеид *P. antarctica* имеет молекулярную массу 190 кДа.

Сложный состав нуклеирующих структур затрудняет их выделение в активной форме, поэтому на протяжении длительного времени строили только теоретические модели вторичной и третичной структур БН. Эффективный нуклеатор льда выстраивает молекулы воды в пространстве в упорядоченные структуры, подобные решетке льда, т.е. аминокислотные остатки, расположенные через соответствующие промежутки, должны быть доступны для образования водородных связей с молекулами воды. Центральный домен белка с повторами хорошо подходит для этой функции. Он содержит высококонсервативные остатки, расположенные через определенные интервалы и потенциально способные образовывать водородные связи [39]. Кроме того, наличие углеводов в нуклеирующих агентах также может обуславливать их активность. Известно, что многие антифризные белки являются гликопротеидами, и при этом углеводной части отводится центральная роль во взаимодействии с молекулами воды [35, 38]. Таким образом, углеводы могут участвовать в образовании связей с атомами водорода и кислорода молекул воды, катализируя или ингибируя кристаллизацию [19].

Данные предположения подтверждаются сообщением Muryoi *et al.* [29] о весьма необычном белке, секретируемом штаммом *Pseudomonas putida*, который известен как ризобактерия арктических растений. Этот белок обладает как нуклеирующей (хотя и не очень высокой), так и антифризной активностью. Очищенный белок *P. putida* имеет молекулярную массу 164 кДа и представляет собой липогликопротеид. Он более гидрофобен, чем обычные БН. Углеводный компонент был необходим для проявления нуклеирующей активности. Был клонирован фрагмент ДНК, кодирующий 473

Химический состав внеклеточных нуклеирующих агентов [16, 28]
Chemical compositions of the cell-free nucleating agents [16, 28]

Компоненты, % Components, %	Вид бактерий Bacterial strain		
	<i>P. antarctica</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>E. uredovora</i>
Протеин Protein	33	56	43
Углевод Carbohydrate	12	15	35
Липид Lipid	55	10	10
Полиамин Polyamine	Не выявлен Not determined	19	12

Complex compositions of nucleating structures hinder isolation of them in the active state, that is why only theoretical models of secondary and tertiary structures of INPs were speculated for a long time. An efficient ice nucleator must align water molecules into an ice-like lattice, *i. e.* amino acid residues spaced at appropriate intervals must be available to hydrogen bonds with water molecules. The central repetitive domain of the protein would be well suited for this function. It contains highly conserved potential hydrogen bond-forming residues at regular intervals [39]. Besides, carbohydrate portion in nucleating agents can also pre-condition their activity. It is known that many antifreeze proteins are glycoproteins in which saccharide components are critical for interactions with water molecules [35, 38]. Thus carbohydrates can participate in forming bonds to hydrogen and oxygen atoms in water molecules catalyzing or inhibiting crystallisation [19].

These considerations were confirmed by Muryoi *et al.* [29], who reported about a rather unusual protein secreted by the strain *Pseudomonas putida*, which is known as the Arctic plant growth-promoting rhizobacterium. This protein exhibits both nucleating (though not very high) and antifreeze activities. It is a 164 kDa lipoglycoprotein, more hydrophobic than conventional INPs. The carbohydrate is required for the ice nucleation activity. A DNA fragment encoding 473 amino acids was cloned. The predicted gene product had a molecular mass of 47.3 kDa. No satisfactory results on expression of the cloned gene of this unusual protein have been obtained so far, since its expression in *E. coli* yielded a smaller lipoglycoprotein (72 kDa) that exhibited lower levels of antifreeze and ice nucleation activities than the native protein.

Mizuno H. [26] suggested two possible conformations of an ice-nucleation protein based on the analyses of conformational energy and the mechanism of crystal growth. Both conformations were low-energy helices.

аминокислоты. Предполагаемый продукт этого гена должен иметь молекулярную массу 47,3 кДа. До настоящего времени не получены удовлетворительные результаты относительно экспрессии клонированного гена необычного белка, так как в *E. coli* он экспрессируется, производя липогликопротеид с меньшей молекулярной массой (72 кДа) и пониженной нуклеирующей и антифризной активностями.

Mizuno H. предложил на основе анализа энергии конформаций и механизма роста кристаллов две возможные конформации для БН [26], которые несут на своей поверхности сайты связывания с атомами водорода для образования водородных связей. Обе предложенные конформации представляют собой низко энергетические спирали. Одна из двух конформаций имеет гексагональную симметрию и, следовательно, она комплементарна гексагональной структуре кристалла льда, другая – пентагональную симметрию, которая может способствовать росту дендритных поликристаллических снежных кристаллов, появляющихся при образовании метастабильного кубического льда.

Schmid *et al.* сообщили, что методом кругового дихроизма было обнаружено присутствие участков со структурой β -складчатого слоя в БН из *P. syringae* [34]. Kajava и Lindow предложили модель трехмерной структуры БН [13], которая предполагает наличие в центральном домене β -шпилек, ограниченных двумя октапептидными повторами. Прямоугольные единицы, образованные группами из трех или более шпилек, будут обладать способностью "переплетаться", формируя большие плоские агрегаты. Эта модель согласуется с гипотезой, отводящей центральному домену с повторами роль формирования матрицы для зародышевого кристалла льда [10]. N- и C-концевые домены могут формировать α -спирали и β -структуры.

Graether и Jia на основе спектров кругового дихроизма и двумерной спектроскопии ЯМР предложили модель третичной структуры БН из *P. syringae* [7], которая описывает участок полипептидной последовательности БН длиной в 144 аминокислотных остатка как β -спираль (рис. 2). Авторы не подтвердили наличие β -шпилек и предположили, что они могут быть только переходной стадией при сворачивании белка в третичную структуру.

Ранее сообщалось, что антифризные белки, выделенные из большого мучного хрущака *Tenebrio molitor* и листовертки-почкоеда елового *Choristoneura fumiferana*, также имеют третичную структуру в виде β -спирали [8]. Примечательно, что антифризные белки тоже обладают повторами, сходными с повторами БН. Однако число повторов в БН почти на порядок больше, чем в антифризах.

Both were found to have an arrangement of hydrogen-binding sites on their surfaces, which fits well with those of hydrogen bonds. Further, one of the two conformations had a hexagonal conformational symmetry consistent with the hexagonal ice crystal lattice. The other conformation had a pentagonal conformational symmetry that could enable the growth of a dendritic polycrystalline snow crystal, which grows on metastable cubic ice.

Schmid *et al.* [34] reported that the circular dichroism spectra of the purified protein indicated the presence of β -sheet structure in INP from *P. syringae*. Kajava и Lindow [13] proposed a model of tertiary structure of an INP which suggested a series of β -hairpins in the central domain, each defined by two octapeptide repeats. The rectangular units formed by three or more hairpins would have the ability to "interdigitate", forming large planar aggregates. This model is consistent with the widely accepted role of the repetitive region as the template for initiating formation of an ice embryo [10]. N- and C-terminal domains may form α -helices and β -structures.

Graether и Jia modelled tertiary structure of the INP from *P. syringae* based on circular dichroism spectra and two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy [7] which describes a fragment of the INP polypeptide sequence of 144 amino acid residues as a β -helix (Fig. 2). The researchers refuted the presence of β -hairpins and assumed that they might be only a transitory structure while the protein is folding in the tertiary conformation.

Previously it was reported that the antifreeze proteins isolated from the yellow mealworm *Tenebrio molitor* and the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* also comprised β -helices [8]. It is noteworthy



Рис. 2. Схематическое изображение β -спирали БН [7].
Fig. 2. Schematic representation of a β -helical INP [7].

Возможно, что оба типа белков взаимодействуют со льдом посредством повторяющегося мотива, принимающего конформацию β -спирали. Основное различие между ингибитором роста льда и катализатором заключается именно в размере поверхности, взаимодействующей со льдом. В БН обширная поверхность функционирует как матрица, которая больше, чем критический размер зародышевого кристалла льда, необходимый для продолжения роста. В антифризах эта поверхность достаточно мала для того, чтобы они, связываясь с зародышевым кристаллом, блокировали его дальнейший рост. Для продолжения роста зародыша кристалла при -12°C (приблизительная температура нуклеации для одиночного БН) он должен представлять собой сферу с площадью поверхности 20100 \AA^2 . Площадь поверхности смоделированного БН около 4200 \AA^2 [8], а для β -спиральных антифризных белков насекомых эта величина составляет приблизительно 250 \AA^2 . Если молекулы воды связываются с поверхностью такого антифриза и формируют лёдоподобные структуры, то зародыши кристаллов оказываются слишком малы для стабильности и дальнейшего роста. Поэтому они с большей вероятностью будут таять, а не расти. Хотя математическое соответствие между площадью поверхности в модельном БН и минимально необходимой площадью поверхности зародышевого кристалла льда далеко от совершенства (расхождение почти в 5 раз), эти величины определенно ближе друг к другу по сравнению с площадями поверхности антифризов и зародышевых кристаллов.

Tsuda *et al.* исследовали синтетический пептид, состоящий из трех повторов, каждый по 8 аминокислотных остатков, повторяющий часть БН *P. syringae* [36]. С помощью ЯМР установлено, что гексапептидный сегмент данного пептида формирует шпильку. Были синтезированы три синтетических пептида, содержащих последовательность Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-Gly-Ser-Asp-Leu-Thr-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Ser, которая является звеном тандемных повторов в центральном домене БН *Xanthomonas campestris* [21]. Обычно в БН присутствует 58–81 повтор такого типа. С помощью ЯМР установлено, что этот пептид формирует сегмент с круглой петлей.

Величина нуклеирующей активности зависит от размера нуклеирующего агента. При этом разница между температурой замерзания D_2O и H_2O не всегда отражает различную степень агрегации нуклеирующих структур. Govindarajan и Lindow [6] продемонстрировали наличие очень крупных (с молекулярной массой около 19000 кДа) агрегатов с высокой нуклеирующей активностью при -2°C . Аналогичное заключение о зависимости нуклеирующей

that antifreeze proteins also have repeats similar to those in INPs, though a single INP has over 10 times more repeats than an antifreeze protein. Probably both types of proteins interact with ice lattice through a repetitive motif formed as a β -helix. The main difference between an inhibitor and a catalyst of ice growth lies namely in the size of the surface interacting with ice embryos. In INPs an extensive surface functions as a template that is bigger than the critical size of an ice embryo required for further growth. In antifreeze proteins this surface is small enough so that they, binding to an ice embryo, block its further growth. For an ice embryo to continue growing at -12°C (the approximate ice-nucleating temperature of one INP), it would have to be a sphere with a surface area of $20,100 \text{ \AA}^2$. The repetitive region of the modelled INP has a surface area of about $4,200 \text{ \AA}^2$ [8], and for β -helical antifreeze proteins from the insects it is approximately 250 \AA^2 . If water molecules bound to an antifreeze protein surface were to form an ice-like arrangement, this embryo would be far too small to be stable and would melt rather than grow. Although the mathematical agreement between the surface area of the modelled INP and the required ice-embryo surface area is not perfect (nearly a fivefold difference), the values are certainly much closer in agreement than that between one antifreeze protein and an ice embryo.

Tsuda *et al.* [36] investigated a synthetic peptide consisting of three repeats each of 8 amino acid residues simulating a part of INP from *P. syringae*. NMR demonstrated that a hexapeptide segment of this peptide formed a hairpin. Three synthetic peptides containing the sequence Gln-Thr-Ala-Arg-Lys-Gly-Ser-Asp-Leu-Thr-Thr-Gly-Tyr-Gly-Ser-Thr-Ser, which is a tandem repetitive motif in the central domain of INP from *Xanthomonas campestris*, were synthesized [21]. As a rule there are 58–81 such repeats in INP. NMR measurements showed that the peptides formed a circular loop.

The level of ice nucleation activity depends on the size of an nucleating agent. It should be noted that D_2O - H_2O difference in freezing spectra would not necessarily be sensitive to differences in aggregation. Govindarajan и Lindow [6] reported about aggregates as large as 19,000 kDa that are active at -2°C . Other researchers drew a similar conclusion about the dependence of ice nucleation activity on aggregate sizes [33]. It was established [2, 6] that nucleating agents active at -2°C are to consist of 50 INPs at least, and those active at -10°C – only of 2 or 3 molecules.

Tandem repeats of glycine and aromatic amino acid residues are crucial for protein self-assembly and aggregation [5].

The model proposed in [13] does not impose theoretical limitations on aggregate sizes. However, selection

щей активности от размеров агрегатов сделали и другие авторы [33]. В работах [2, 6] установлено, что нуклеирующие агенты с активностью при -2°C должны состоять по крайней мере из 50 БН, а агенты, активные при -10°C – только из 2 или 3-х молекул.

Тандемные повторы из остатков глицина и ароматических аминокислот играют главную роль в процессах самосборки и агрегации белков [5].

Предложенная модель [13] не имеет теоретических ограничений для размеров агрегатов. Однако давление естественного отбора может действовать против формирования слишком крупных агрегатов, что, вероятно, обусловлено биологическим пределом возможных размеров нуклеирующих структур [11]. Mueller *et al.* [27] исследовали агрегацию БН *in situ* с помощью иммунофлуоресцентных зондов. Они наблюдали аномальную кривизну поверхности клеток в районах нахождения нуклеирующих структур, которые активны при -5°C и выше, и которые, следовательно, являются наиболее крупными. Безусловно, предположение о влиянии аномальности кривизны на жизнеспособность клеток требует дальнейшей экспериментальной проверки, поскольку она может быть обусловлена эффектом самого зонда [11]. Кроме того, данное наблюдение было сделано на *E. coli*, несущей плазмиду с геном БН. Проверку следует осуществлять на бактериях, которым в естественных условиях присуща нуклеирующая активность. Наконец, даже если клетки, несущие очень крупные нуклеирующие агрегаты, имеют пониженную жизнеспособность популяции в целом, так как только небольшая часть клеток в популяции обладает такими агрегатами.

Вероятно, за агрегацию БН ответственны углеводные компоненты. Известна способность лектинов, имеющих сродство с маннозой, собирать на внешней мембране клеток молекулы БН и формировать из них стабильные агрегаты. В данном случае не выяснено, действуют ли БН как свои собственные лектины, т. е. способны они к самоагрегации, или на поверхности бактериальной мембраны существуют лектино-подобные молекулы. Возможно, что в агрегации нуклеирующих структур принимают участие лектины растений.

Поскольку лёдонуклеирующие бактерии активно изучаются как с точки зрения их значения для холодоустойчивости растений, так и применения в различных областях биотехнологии и прикладной науки, необходимы расширенные и углубленные исследования в этом направлении. Уникальные свойства БН и кодирующих их генов открывают заманчивые перспективы в сферах разработки новых методов биоочистки окружающей среды, производства искусственного снега, хранения

pressure may occur against the formation of too large aggregates, which may be attributed to a biological limit to the possible size of nucleating structures [11]. Mueller *et al.* [27] examined INP aggregation *in situ* by immunofluorescent probes. They observed abnormal curvature of the cell surface where nucleating structures active at -5°C and above (*i. e.* the largest ones) were located. There is no doubt that the hypothesis about the influence of abnormality in the cell surface curvature on the cell viability needs further experimental evidences, since the abnormality could be caused by the probe itself [11]. In addition, these results were obtained in *E. coli* carrying a plasmid with an INP gene. The cross check should be performed in bacteria with the natural ice nucleation activity. Finally, even if cells with very large aggregates are less viable, this does not imply reduced fitness for the entire population, as only a small fraction of cells possesses such aggregates.

Carbohydrate components are likely to be responsible for INP aggregation. Lectins with affinity for mannose are able to bring together INP molecules on the outer cell surface and form stable aggregates from them. Whether INP acts as its own lectin and self-aggregates, or whether there is some additional bacterial surface lectin-like molecule is unclear. Perhaps, plant lectins take part in aggregation of nucleating structures.

Since ice-nucleating bacteria are intensively studied with relation both to their importance for cold tolerance of plants and to usage in various fields of biotechnology and applied science, investigations in this line need widening and deepening. The unique properties of INPs and genes encoding them offer intriguing prospects for the development of novel methods of bioremediation of environment, artificial snow industry, food storage and so on. We are planning to discuss the main fields of possible application of biological bacterial nucleators in the next report.

References

1. Abe K., Watabe S., Emori Y. *et al.* An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity // *FEBS Lett.* – 1989. – Vol. 258, N2. – P. 297–300.
2. Burke M.J., Lindow S.E. Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: Theoretical considerations // *Cryobiology.* – 1990. – Vol. 27, N1. – P. 80–84.
3. Corroto L.V., Wolber P.K., Warren G.J. Ice nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens*: mutagenesis complementation analysis and identification of a gene product // *EMBO J.* – 1986. – Vol. 5, N2. – P. 231–236.
4. Ferguson M.A.J., Williams A.F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures // *Annu. Rev. Biochem.* – 1988. – Vol. 57. – P. 285–320.
5. Gazit E. Global analysis of tandem aromatic octapeptide repeats: the significance of the aromatic-glycine motif // *Bioinformatics.* – 2002. – Vol. 18, N6. – P. 880–883.

продуктов питания и многое другое. Мы планируем рассмотреть основные области возможного применения биологических нуклеаторов бактериального происхождения в следующем сообщении.

Литература

1. Abe K., Watabe S., Emori Y. et al. An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas*: sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity // FEBS Lett.– 1989.– Vol. 258, N2.– P. 297–300.
2. Burke M.J., Lindow S.E. Surface properties and size of the ice nucleation site in ice nucleation active bacteria: Theoretical considerations // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N1.– P. 80–84.
3. Corroto L.V., Wolber P.K., Warren G.J. Ice nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens*: mutagenesis complementation analysis and identification of a gene product // EMBO J.– 1986.– Vol. 5, N2.– P. 231–236.
4. Ferguson M.A.J., Williams A.F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures // Annu. Rev. Biochem.– 1988.– Vol. 57.– P. 285–320.
5. Gazit E. Global analysis of tandem aromatic octapeptide repeats: the significance of the aromatic-glycine motif // Bioinformatics.– 2002.– Vol. 18, N6.– P. 880–883.
6. Govindarajan A.J., Lindow S.E. Size of bacterial ice-nucleation sites measured in situ by radiation inactivation analysis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1988.– Vol. 85, N5.– P. 1334–1338.
7. Graether S.P., Jia Z. Modeling *Pseudomonas syringae* ice-nucleation protein as a β -helical protein // Biophys. J.– 2001.– Vol. 80, N3.– P. 1169–1173.
8. Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M. et al. β -helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect // Nature.– 2000.– Vol. 406, N6793.– P. 325–327.
9. Green R.L., Corotto L.V., Warren G.J. Deletion mutagenesis of the ice nucleation genes from *Pseudomonas syringae* S203 // Mol. Gen. Genet.– 1988.– Vol. 215, N1.– P. 165–172.
10. Green R.L., Warren G.J. Physical and functional repetition in a bacterial ice gene // Nature (London).– 1985.– Vol. 317, N6038.– P. 645–648.
11. Gurian-Sherman D., Lindow S.E. Bacterial ice nucleation: significance and molecular basis // FASEB J.– 1993.– Vol. 7, N14.– P. 1338–1343.
12. Hew C.L., Yang D.S.C. Protein interaction with ice // Eur. J. Biochem.– 1992.– Vol. 203, N 1-2.– P. 33–42.
13. Kajava A.V., Lindow S.E. A model for the three-dimensional structure of ice nucleation proteins // J. Mol. Biol.– 1993.– Vol. 232, N3.– P. 709–717.
14. Kawahara H. The structures and functions of ice-crystal-controlling proteins from bacteria // J. Biosci. Bioeng. – 2002.– Vol. 94, N6.– P. 492–496.
15. Kawahara H., Mano Y., Hamada R. et al. Role of spermidine in the ice-nucleating activity of the EIM from *Erwinia uredovora* KUIN-3 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1994.– Vol. 58, N12.– P. 2201–2206.
16. Kawahara H., Mano Y., Obata H. Purification and characterization of extracellular ice-nucleating matter from *Erwinia uredovora* KUIN-3 // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1993.– Vol. 57, N9.– P. 1429–1432.
17. Kawahara H., Matsushita M., Yamade K. et al. The control of the production and secretion of extracellular ice-nucleating material of *Erwinia uredovora* KUIN-3 // Biocontrol. Sci.– 1999.– Vol. 4, N1.– P. 9–16.
18. Kozloff L.M., Schofield M.A., Lute M. Ice nucleation activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola* // J. Bacteriol.– 1983.– Vol. 153, N1.– P. 222–231.
19. Kozloff K.M., Turner M.A., Arellano F. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes // J. Bacteriol.– 1991.– Vol. 173, N20.– P. 6528–6536.
20. Kozloff L.M., Turner M.A., Arellano F. et al. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria // J. Bacteriol.– 1991.– Vol. 173, N6.– P. 2053–2060.
21. Kumaki Y., Kawano K., Hikichi K. et al. A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein // Biochem. Biophys. Res. Commun.– 2008.– Vol. 371, N1.– P. 5–9.
22. Low M.G. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins // FASEB J.– 1989.– Vol. 3.– P. 1600–1608.
23. Maki L.R., Willoughby K.J. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei // J. Appl. Meteorol.– 1978.– Vol. 17, Issue 7.– P. 1049–1053.
24. Michigami Y., Abe K., Iwabuchi K. et al. Formation of ice-nucleation-active vesicle in *Erwinia uredovora* at low temperature and transport InaU molecules into shed vesicles // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1995.– Vol. 59, N10.– P. 1996–1998.
25. Michigami Y., Watabe S., Abe K. et al. Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora* // Biosci. Biotechnol. Biochem.– 1994.– Vol. 58, N4.– P. 762–764.
26. Mizuno H. Prediction of the conformation of ice-nucleation protein by conformational energy calculation // Proteins.– 1989.– Vol. 5, N1.– P. 47–65.
27. Mueller G.M., Wolber P.K., Warren G.J. Clustering of ice nucleation protein correlates with ice nucleation activity // Cryobiology.– 1990.– Vol. 27, N4.– P. 416–422.

19. Kozloff K.M., Turner M.A., Arellano F. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes // J. Bacteriol.— 1991.— Vol. 173, N20.— P. 6528–6536.
20. Kozloff L.M., Turner M.A., Arellano F. et al. Phosphatidylinositol, a phospholipid of ice-nucleating bacteria // J. Bacteriol.— 1991.— Vol. 173, N6.— P. 2053–2060.
21. Kumaki Y., Kawano K., Hikichi K. et al. A circular loop of the 16-residue repeating unit in ice nucleation protein // Biochem. Biophys. Res. Commun.— 2008.— Vol. 371, N1.— P. 5–9.
22. Low M.G. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins // FASEB J.— 1989.— Vol. 3.— P. 1600–1608.
23. Maki L.R., Willoughby K.J. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei // J. Appl. Meteorol.— 1978.— Vol. 17, Issue 7.— P. 1049–1053.
24. Michigami Y., Abe K., Iwabuchi K. et al. Formation of ice-nucleation-active vesicle in *Erwinia uredovora* at low temperature and transport InaU molecules into shed vesicles // Biosci. Biotechnol. Biochem.— 1995.— Vol. 59, N10.— P. 1996–1998.
25. Michigami Y., Watabe S., Abe K. et al. Cloning and sequencing of an ice nucleation active gene of *Erwinia uredovora* // Biosci. Biotechnol. Biochem.— 1994.— Vol. 58, N4.— P. 762–764.
26. Mizuno H. Prediction of the conformation of ice-nucleation protein by conformational energy calculation // Proteins.— 1989.— Vol. 5, N1.— P. 47–65.
27. Mueller G.M., Wolber P.K., Warren G.J. Clustering of ice nucleation protein correlates with ice nucleation activity // Cryobiology.— 1990.— Vol. 27, N4.— P. 416–422.
28. Muryoi N., Kawahara H., Obata H. Properties of a novel extracellular cell-free ice nuclei from ice-nucleating *Pseudomonas antarctica* IN-74 // Biosci. Biotechnol. Biochem.— 2003.— Vol. 67, N9.— P. 1950–1958.
29. Muryoi N., Sato M., Kaneko S. et al. Cloning and expression of afpA, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 // J. Bacteriol.— 2004.— Vol. 186, N17.— P. 5661–5671.
30. Muryoi N., Matsukawa K., Yamade K. et al. Purification and properties of an ice-nucleating protein from an ice-nucleating bacterium, *Panthoea ananatis* KUIN-3 // J. Biosci. Bioeng.— 2003.— Vol. 95, N2.— P. 157–163.
31. Obata H., Takinami K., Tanishita J. et al. Identification of a new ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties // Agric. Biol. Chem.— 1990.— Vol. 54, N3.— P. 725–730.
32. Orser C.S., Staskawicz B.J., Panopoulos N.J. et al. Cloning and expression of ice nucleation genes from *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola* in *Escherichia coli* // Phytopathology.— 1982.— Vol. 72, N7.— P. 1000.
33. Southworth M.W., Wolber P.K., Warren G.J. Nonlinear relationship between concentration and activity of a bacterial ice nucleation protein // J. Biol. Chem.— 1988.— Vol. 263, N29.— P. 15211–15216.
34. Schmid D., Pridmore D., Capitani G. et al. Molecular organisation of the ice nucleation protein InaV from *Pseudomonas syringae* // FEBS Lett.— 1997.— Vol. 414, N3.— P. 590–594.
35. Shier W.T., Lin Y., DeVries A.L. Structure and mode of action of glycoproteins from an antarctic fish // Biochim. Biophys. Acta.— 1972.— Vol. 263, N2.— P. 406–413.
36. Tsuda S., Ito A., Matsushima N. A hairpin-loop conformation in tandem repeat sequence of the ice nucleation protein revealed by NMR spectroscopy // FEBS Lett.— 1997.— Vol. 409, N2.— P. 227–231.
37. Turner M.A., Arellano F., Kozloff L.M. Components of ice nucleation structures of bacteria // J. Bacteriol.— 1991.— Vol. 173, N20.— P. 6515–6527.
38. Vandenheede J.R., Ahmed A.I., Feeney R.E. Structure and role of carbohydrate in freezing point-depressing glycoproteins from an antarctic fish // J. Biol. Chem.— 1972.— Vol. 247, N24.— P. 7885–7889.
39. Warren G.J., Corotto L.V. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae* // Gene.— 1989.— Vol. 85, N1.— P. 239–242.
40. Warren G.J., Corotto L.V., Wolber P.K. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas* // Nucleic Acids Res.— 1986.— Vol. 14, N20.— P. 8047–8060.
41. Whitman M., Cantley L. Phosphoinositide metabolism and the control of cell proliferation // Biochim. Biophys. Acta.— 1989.— Vol. 948, N3.— P. 327–344.
42. Wolber P.K., Deininger C.A., Southwork M.K. et al. Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1986.— Vol. 83, N19.— P. 7256–7260.
43. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis* // Microbiology.— 2009.— Vol. 155, Pt. 4.— P. 1164–1169.

Accepted in 16.02.2010

39. Warren G.J., Corotto L.V. The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas syringae* // Gene.– 1989.– Vol. 85, N1.– P. 239–242.
40. Warren G.J., Corroto L.V., Wolber P.K. Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas* // Nucleic Acids Res.– 1986.– Vol. 14, N20.– P. 8047–8060.
41. Whitman M., Cantley L. Phosphoinositide metabolism and the control of cell proliferation // Biochim. Biophys. Acta.– 1989.– Vol. 948, N3.– P. 327–344.
42. Wolber P.K., Deininger C.A., Southwork M.K. et al. Identification and purification of a bacterial ice-nucleation protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1986.– Vol. 83, N19.– P. 7256–7260.
43. Wu Z., Qin L., Walker V.K. Characterization and recombinant expression of a divergent ice nucleation protein from *Pseudomonas borealis* // Microbiology.– 2009.– Vol. 155, Pt. 4.– P. 1164–1169.

Поступила 16.02.2010
Рецензент В.В. Рязанцев