



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIP. DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

LE PROTEINE ANTIFREEZE IN NATURA E LORO UTILIZZI IN CAMPO
ALIMENTARE

Relatore
Prof. Simone Vincenzi

Laureanda/o
Matilde Boschetti
Matricola n.1027076

ANNO ACCADEMICO 2014 - 2015

INDICE GENERALE

INDICE	5
RIASSUNTO	7
SUMMARY	10
INTRODUZIONE	13
1RUOLO DELLE PROTEINE ANTIFREEZE	15
1.1ORIGINE DELLE PROTEINE ANTIFREEZE	15
1.1.1EVOLUZIONE DELLE PROTEINE ANTIFREEZE ANIMALI	15
1.1.2EVOLUZIONE DELLE PROTEINE ANTIFREEZE VEGETALI	17
2.STRUTTURA DELLE PROTEINE ANTIFREEZE	20
2.1GLICOPROTEINE ANTIFREEZE (AFGP)	20
2.1.1 STRUTTURA PRIMARIA (AFGP)	20
2.1.2 STRUTTURA SECONDARIA(AFGP)	21
2.1.3 STRUTTURA TERZIARIA (AFGP)	22
2.2.PROTEINE ANTIFREEZE DI PRIMO TIPO (AFP I)	22
2.2.1.STRUTTURA PRIMARIA (AFP I)	22
2.2.2.STRUTTURA SECONDARIA (AFP I)	23
2.2.3STRUTTURA TERZIARIA(AFPI)	24
2.3 PROTEINE ANTIFREEZE DI SECONDO TIPO(AFP II)	24
2.3.1 STRUTTURA PRIMARIA (AFP II)	24
2.3.2 STRUTTURA SECONDARIA-TERZIARIA (AFP II)	25
2.4 PROTEINE ANTIFREEZE DI TERZO TIPO (AFPIII)	26
2.4.1 STRUTTURA PRIMARIA (AFP III)	26
2.4.2 STRUTTURA SECONDARIA TERZIARIA (AFPIII)	27
2.5 NUOVE STRUTTURE AFP ANIMALI	27
2.6 STRUTTURA E LEGAME AFP VEGETALI	27
3 MECCANISMO DI FUNZIONAMENTO AFP	31
3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLE AFP	32
3.2 TEST SPERIMENTALI IPOTESI INIBIZIONE NUCLEAZIONE	33
3.2.1 NUCLEAZIONE OMOGENEA	33
3.2.2NUCLEAZIONE ETEROGENEA	34
3.3 TEST SPERIMENTALI IPOTESI INIBIZIONE CRESCITA GHIACCIO	35
3.4 STUDIO MECCANISMO AFGP	35
3.4.1 INIBIZIONE CRESCITA SU FACCE SPECIFICHE	35

3.4.2 COPERTURA QUANTITATIVA FACCIATA DI CRESCITA	36
3.4.3 RICRISTALLIZZAZIONE	37
4. TECNICHE RILEVAZIONE AFP	38
4.1 SPLAT ASSAY	38
4.1.1. SPLAT COOLING ASSAY	39
4.1.2. SPLAT ASSAY A SANDWICH DI SACCAROSIO	40
4.1.2.1 VANTAGGI	40
4.1.2.2 SVANTAGGI	41
4.2 SAGGIO DI CAPILLARITA'	41
4.2.1 VANTAGGI	42
4.3 NANOLITER OSMOMETER	42
4.3.1 VANTAGGI	43
4.3.2 SVANTAGGI	44
4.4 DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETER	44
4.4.1 STRUMENTAZIONE DSC	44
4.4.2 VANTAGGI	46
4.4.3 SVANTAGGI	46
4.5 NANOBIO TECNOLOGIE	46
4.5.1 VANTAGGI	47
4.5.2 SVANTAGGI	47
5. APPLICAZIONE BIOTECNOLOGICHE AFP	48
5.1 PRODOTTI ALIMENTARI CONGELATI	49
5.2 PIANTE TRANSGENICHE	52
5.3 INGEGNERIA GENETICA	53
5.4 CRIOCONSERVAZIONE TESSUTI E ORGANI	54
5.4.1 OVOCITI E EMBRIONI	54
5.4.2 APPLICAZIONE AL LIQUIDO SEMINALE	55
5.4.3 PIASTRINE	55
5.4.4 GLOBULI ROSSI	56
5.5 CRIOCHIRURGIA	56
CONCLUSIONI	57
BIBLIOGRAFIA	58

RIASSUNTO

Verso la fine del ventesimo secolo alcuni ricercatori hanno isolato e analizzato delle molecole antigelo presenti in natura che hanno identificato come proteine e glicoproteine antifreeze.

Gli studi attualmente sono approfonditi ma non ancora del tutto completi. Le proteine antifreeze (AFP) e le glicoproteine antifreeze (AFGP) comprendono classi di proteine strutturalmente diverse, che hanno in comune l'abilità di legarsi al ghiaccio e inibire la sua crescita e per questo motivo sono state considerate strategie di termo-resistenza o termo-tolleranza messe in atto da alcuni organismi come pesci marini, insetti, piante e batteri per sopravvivere a condizioni ambientali avverse.

Si è constatato attraverso gli studi effettuati che solamente un ristretto numero di proteine servono come molecole anti-congelamento.

Le mutazioni avvenute durante il processo evolutivo delle proteine antifreeze, hanno aumentato le loro potenzialità e hanno contribuito alla selezione naturale delle specie sia animali che vegetali.

Per quanto riguarda l'evoluzione dell'attività antifreeze nei vegetali, si pensa che le AFP possano derivare dalle Pathogenesis Related Protein (PR) che nel tempo hanno subito delle mutazioni che hanno indotto la conversione delle proprietà di patogeno-resistenza in proprietà antifreeze. L'applicazione delle tecniche di risonanza magnetica nucleare (NMR) e di cristallografia a raggi X ha permesso di studiare in dettaglio la struttura tridimensionale di queste proteine, portando alla costruzione di modelli sempre più completi che hanno contribuito a comprendere la modalità con cui la struttura proteica aderisce al ghiaccio.

Tramite questi studi sono state evidenziate le caratteristiche strutturali delle proteine:

- hanno diversi livelli di organizzazione strutturale;
- la loro composizione in amminoacidi e la conformazione molecolare influenzano l'esplicazione delle proprietà antifreeze;
- il corretto funzionamento delle proteine antifreeze è garantito dalla presenza di legami idrogeno e residui amminici idrofobici;
- sono stati evidenziati possibili effetti di sinergia tra molecole proteiche antifreeze;

- l'esistenza dell'interazione tra le proteine e la superficie dei cristalli di ghiaccio influenza inoltre la direzione e la velocità di crescita dei cristalli, insieme alla loro morfologia;

- le molecole antifreeze hanno la capacità di inibire la formazione del ghiaccio sia in un sistema puro come l'acqua sia in presenza di impurità, come molecole o soluti;

L'attività antifreeze può essere quantificata e osservata tramite vari metodi convenzionali, che si concentrano su differenti aspetti della stessa attività.

Le tecniche più utilizzate per determinare l'attività IRI (Ice Recrystallization Inhibition) e la THA (Thermal Hysteresis Activity) sono lo Splat assay e il Nanoliter osmometer, però esistono anche altre possibilità come quella di applicare la Differential Scanning Calorimetry, il Capillary assay e le Nanobiotecnologie.

L'acquisizione di nuove conoscenze sulle proteine antifreeze ha permesso di coinvolgerle in diversi campi d'applicazione, comprese le tecnologie alimentari. Le proteine antifreeze infatti possono fornire maggiori opportunità nella gestione della fase di conservazione degli alimenti poiché possono controllare la struttura e la dimensione dei cristalli di ghiaccio.

Nel settore alimentare vengono sfruttate per migliorare la consistenza e le proprietà dei cibi congelati durante lo stoccaggio refrigerato, riducendo la dispersione dei nutrienti causata dalla fase di scongelamento dei prodotti.

Un ulteriore impiego di tali molecole biologiche riguarda il miglioramento della tolleranza al gelo in vegetali e animali che nell'ambiente naturale ne sarebbero suscettibili tramite inserimento dei geni che codificano per esse.

Sono presenti inoltre altre possibili applicazioni delle AFP in ambiti diversi da quello alimentare, quali ad esempio la crioconservazione delle cellule, dei tessuti, delle linee cellulari e degli organi da trapiantare, o il loro utilizzo nella distruzione delle cellule affette da carcinoma tramite crio-chirurgia.

Questo dimostra come ancora una volta l'uomo può ricavare delle informazioni utili dai meccanismi che sono già presenti in natura per

rielaborarle e trovare delle soluzioni che siano compatibili a livello ambientale e salutistico.

SUMMARY

Towards the end of the twentieth century some American researchers have isolated and analyzed antifreeze molecules found in nature that they identified as proteins and antifreeze glycoproteins.

Studies currently are extensive but not yet fully complete.

The antifreeze protein (AFP) and the antifreeze glycoproteins (AFGP) include structurally different classes of proteins, which have in common the ability to bind to ice and inhibit its growth, and for this reason they were considered a strategy of thermo-resistance or thermo-tolerance implemented by some organisms such as marine fish, insects, plants and bacteria to survive in adverse environmental conditions. It was found that only a small number of protein molecules serve as anti-freeze.

The mutations occurred during the evolutionary process of the antifreeze protein, have increased their potential and have contributed to the natural selection of both animal and vegetable species.

Regarding the evolution of antifreeze proteins in plants, it is thought that the AFP can derive from Pathogenesis Related Protein (PR), which over time have undergone mutations that led to the conversion of the properties of pathogen-resistance in antifreeze ones.

After identifying the origin of the proteins and antifreeze glycoproteins, studies to identify the basic details that characterize the structure of these macromolecules have been carried out.

The application of the techniques of nuclear magnetic resonance (NMR) and X-ray crystallography has allowed to describe in detail the structure of these molecules, leading to the construction of more and more complete models to describe the mode of adsorption of the ice to the protein structure.

In consequence to the elucidation on the structural conformation of the protein, it could be clarified also the working mechanism characterizing AFGP and AFP.

It was discovered that it is not colligative, as it depends on both concentration and the composition of the molecules involved in the binding to ice.

The existence of interaction between the proteins and the surface of the ice crystals also leads to a change in the direction and speed of growth of the crystals.

It was also highlighted a possible collaborative effect between antifreeze protein molecules.

The most important factor ensuring the proper function of the antifreeze protein is the presence of hydrogen bonds and hydrophobic amino residues, in addition, it has been demonstrated that the side of the binding of proteins with the ice is flat.

A series of experiments to test the ability of the molecules AFP and AFGP to inhibit the formation of ice in both pure water and solution containing impurities was carried out.

The antifreeze activity can be quantified and observed by various conventional methods, which focus on different aspects of the same activity.

The techniques used to determine the activity IRI (Ice Recrystallization Inhibition) and THA (Thermal Hysteresis Activity) are Splat assay and nanoliter osmometer, but there are other possibilities, such as applying the Differential Scanning Calorimetry, the Capillary assay and Nanobiotechnology.

The antifreeze proteins are involved in various application fields, including food technologies which are exploited to improve the texture and properties of frozen food during refrigerated storage, reducing the dispersion of nutrients caused during the thawing of the products.

Thanks to this, the antifreeze proteins can provide more opportunities in the management of the phase of preservation of foods because they can control the structure and the size of the ice.

A further use of such biological molecules relates to improvement of frost tolerance in plants and animals in the natural environment that it would be likely via insertion of the genes coding for them.

Among the non-food applications of AFP are the cryopreservation of cells, tissues, cell lines and organs to be transplanted and the destruction of the cells affected by cancer through cryosurgery.

This demonstrates once again the man can obtain useful information from the mechanisms that are already present in nature for rework and find solutions that are environmentally compatible and healthy.

INTRODUZIONE

La trattazione dell'elaborato finale riguarderà l'esistenza in natura di proteine e glicoproteine antifreeze e le loro applicazioni nel settore alimentare.

Tali proteine possiedono l'abilità di legarsi al ghiaccio e di inibire la sua crescita in organismi animali e vegetali, inclusi funghi e batteri.

Le proteine antifreeze sono state definite come strategie di tolleranza e/o resistenza al congelamento messe in atto da esseri viventi per adattarsi ad ambienti altrimenti difficili da colonizzare.

Grazie alle loro proprietà intrinseche di abbassamento del punto di congelamento dei liquidi vitali e di inibizione della ricristallizzazione, tali molecole biologiche sono valutate con interesse per essere inserite sottoforma di innovazione in diversi ambiti della scienza moderna.

Nel campo alimentare sono ricercate per riuscire ad aumentare la shelf-life dei prodotti alimentari congelati, mentre nel settore delle biotecnologie vengono messi in atto dei trasferimenti di geni codificanti per le proteine antifreeze (AFP) o per le glicoproteine antifreeze (AFGP) da organismi che presentano in origine queste risorse a colture suscettibili ai danni causati dal gelo, per aumentarne la resistenza e la produttività.

Questa tecnica di trasferimento delle informazioni genetiche che codificano per proteine antifreeze può inoltre permettere di allevare pesci che sono sensibili alle basse temperature in paesi dove, date le condizioni climatiche, la loro sopravvivenza non sarebbe possibile, quindi consentendo di praticare l'acquacoltura durante tutti i mesi dell'anno e influenzando positivamente sul rendimento commerciale di questi futuri prodotti alimentari.

Si vedrà proseguendo nella consultazione della tesi che il settore alimentare non è l'unico ambito in cui le proteine e glicoproteine antifreeze sono coinvolte, infatti esse possono essere utilizzate in criobiologia nella preservazione della vitalità delle cellule, di organi e di tessuti a seguito di trattamenti di congelamento-scongelo, nel ruolo di soluzioni crioprotettive.

Ulteriore aspetto da considerare è l'applicazione delle medesime molecole in criochirurgia in caso di presenza di carcinomi, con l'obiettivo di

mantenere l'integrità e la funzionalità di tessuti sani andando invece a impedire la proliferazione di quelli danneggiati.

Per migliorare la comprensione del funzionamento e del ruolo di queste AFP, nell'argomentazione verrà affrontata l'analisi della struttura e del meccanismo d'azione delle stesse, puntando soprattutto sull'esposizione delle diverse metodologie di rilevazione della presenza e dell'esplicazione della loro attività che comprendono: Splat Assay, Nanoliter Osmometer, DSC, Capillary assay insieme alle nuove tecniche di Nanobiologia.

Verrà inoltre offerto un confronto tra le differenti tecniche come punto di riflessione sulla possibilità di incorporarle in un unico metodo che dimostri di possedere un'efficacia equiparabile ai procedimenti presi in considerazione singolarmente nel rilevare e quantificare i parametri sopradetti.

Con l'obiettivo di fornire elementi aggiuntivi che contribuiscano alla totale comprensione del fenomeno dell'anticongelamento associato alle proteine e glicoproteine antifreeze, verranno esposti alcuni postulati teorici riguardanti il fenomeno colligativo di abbassamento del punto di congelamento di soluzioni AFP/AFGP ideali e reali, l'attività di inibizione dell'adsorbimento delle proteine e della nucleazione del ghiaccio.

L'osservazione e lo studio delle proprietà delle proteine antifreeze sono estremamente attuali.

Nonostante alcuni aspetti inerenti alle loro funzioni non siano stati ancora completamente chiariti, con uno specifico riferimento al settore alimentare di nostro interesse, indubbia è la possibilità di applicarle in futuro per aumentare la resa agricola di vegetali suscettibili alle basse T in ambienti che normalmente non consentirebbero la loro sopravvivenza.

Questo è stato confermato dal successo delle prove sperimentali che hanno trasferito geneticamente tali proprietà in cultivar sensibili.

Ciò consentirebbe di colmare le lacune alimentari esistenti oggi e di andare incontro alle esigenze di una popolazione che sarà destinata ad aumentare considerevolmente nei decenni a venire.

CAPITOLO 1 : RUOLO DELLE PROTEINE ANTIFREEZE

Le proteine antifreeze (AFP) e le glicoproteine antifreeze, (AFGP) comprendono classi di proteine strutturalmente diverse, che hanno in comune l'abilità di legarsi al ghiaccio e inibire la sua crescita (Yeh et al.1996).

Normalmente la temperatura di fusione e di congelamento nell'ambito della stessa sostanza coincidono.

L'azione delle AFP sulla superficie del ghiaccio, porta ad un abbassamento del punto di congelamento dell'acqua, fino ad arrivare al di sotto del punto di fusione del ghiaccio, portando di conseguenza ad una situazione di non equilibrio tra la fase solida e liquida dell'acqua.

La temperatura a cui si verifica tale situazione viene definita "punto di isteresi termica" misurabile in °C.

Le proteine antifreeze agiscono portando all'inibizione della ricristallizzazione, in particolare quando il ghiaccio si avvicina alla temperatura di fusione e diventa più fluido.

Come risultato di queste proprietà positive, le AFP e le AFGP sono state considerate come strategie di termo-resistenza o termo-tolleranza utilizzate da alcuni organismi come pesci marini, insetti, piante e batteri per sopravvivere a condizioni ambientali avverse (Sun et al.1995).

Per alcune proteine antifreeze sono state riconosciute molteplici origini dell'azione antigelo biologica.

1.1 ORIGINI DELLE PROTEINE ANTIFREEZE

1.1.1 Evoluzione delle proteine antifreeze animali

La maggioranza delle proteine non ha affinità per il ghiaccio, evidenziata dalla mancanza di attività d'isteresi termica e dal loro fallimento nell'influenzare la forma dei cristalli di ghiaccio durante la loro crescita.

E' intuitivo pensare che solamente un ristretto numero di proteine differenti strutturalmente servano come molecole anti-congelamento.

La distribuzione quasi casuale delle tipologie di proteine antifreeze nei pesci, durante la speciazione dei teleostei, è stata citata come evidenza per

la loro recente evoluzione, probabilmente in risposta alla glaciazione a livello del mare avvenuta appena tra dieci milioni e un milione di anni fa (Scott et al.1986; Davies et al.1993).

Si presume che un rilevante numero di proteine nei pesci abbia una certa affinità per il ghiaccio.

Le possibilità di mutazione hanno aumentato l'attività antigelo e insieme all'amplificazione genica accoppiata alla selezione naturale, hanno fissato diverse proteine antifreeze in differenti specie di pesci.

La comparsa di due diverse AFP, di quarto e di primo tipo, in due specie strettamente correlate di scorpioni di mare (*longhorn* e *shorthorn*), sembra supportare questa teoria.

Ne deriva quindi che non ci si può basare solamente sul rapporto filogenetico degli organismi per identificare il tipo di AFP utilizzato in una specie particolare. Nonostante ciò, tra molti tipi di proteine antifreeze selezionati indipendentemente, il numero effettivo di strutture con potenzialità nel legare il ghiaccio è probabilmente limitato.

Sappiamo per esempio che è stata riportata la presenza di AFP strutturalmente simili in pesci anche filogeneticamente molto lontani tra loro.

Un esempio molto più rilevante della convergenza evolutiva è il ritrovamento di glicoproteine antifreeze in pesci notiotenoidi e in merluzzi artici, che appartengono addirittura a differenti superordini (Chen et al.1997; Logsdon et al.1997).

Le glicoproteine antifreeze sono tra loro molto simili essendo costituite principalmente da ripetizioni di alanina-alanina-treonina, caratterizzate dalla presenza di un disaccaride attaccato alla treonina, ed esistenti come una serie di isoforme con ripetizioni amminoacidiche di differenti lunghezze, derivanti da precursori poliproteici.

Nonostante queste similarità a livello proteico, le proteine antifreeze dimostrano di avere origini indipendenti, da differenti precursori genetici.

Il gene delle glicoproteine antifreeze dei pesci antartici, sembrerebbe derivare da un gene del tripsinogeno con un'estesa amplificazione interna di nove coppie di basi azotate codificanti per la ripetizione del tripeptide (Chen et al 1997).

Il gene codificante per le glicoproteine antifreeze nei merluzzi artici è completamente non correlato:

a) non ha omologie con il gene del tripsinogeno;

b) è caratterizzato da differente organizzazione degli introni e degli esoni;

c) presenta differenti sequenze spaziatriche delle poliproteine e una diversa polarizzazione del codone.

Ad oggi non sono state riscontrate omologie tra le proteine antifreeze dei pesci e quelle di organismi diversi da essi.

A conferma di questo, le proteine AFP degli insetti non hanno omologhi.

1.1.2 Evoluzione delle proteine antifreeze vegetali

Le AFP sono state purificate da diversi gruppi di piante, incluse gimnosperme, dicotiledoni e monocotiledoni.

E' stata suggerita l'evoluzione dell'attività antifreeze dalle PR-proteins.

Infatti, sulla base di numerose evidenze, le proteine antifreeze della segale invernale sono omologhe a molte proteine di patogeno resistenza.

Benché non sia chiaro se queste proteine antifreeze vegetali giochino un doppio ruolo nella resistenza alle malattie e nella tolleranza al freddo, è pur vero che molte PR-proteins non mostrano alcuna attività antigelo specifica.

Le DcAFP della carota, omologhe delle Polygalacturonase Inibitor Glycoprotein (PIGP), sono state scoperte essere incapaci di inibire la poligalatturonasi 6 estratta da *Aspergillus niger*, suggerendo che le DcAFP non sono proteine con doppie funzioni (Worral et al. 1998).

La similarità di sequenze con PIGP suggerisce che si potrebbe trattare di mutazioni del sito attivo del gene PIGP con la conseguente perdita della funzione di inibizione della poligalatturonasi.

Ulteriori analisi tramite due saggi d'ibridazione, usando le DcAFP (PIGP) e la poligalatturonasi del fungo *Alternaria alternata*, mostrano che non ci sono interazioni tra le due molecole (Zhang et al. 2006).

Una comparazione della sequenza di DcAFP con altre PIGP mostra la sostituzione di un largo numero di residui non conservabili con amminoacidi basici nella conformazione a β -foglietto di DcAFP, la quale

provoca un cambiamento nella carica della superficie, facendola diventare positiva.

Questo può prevenire il legame della DcAFP con la poligalatturonasi che è anch'essa carica positivamente, perché abbiamo repulsione elettrostatica.

La comparazione delle sequenze di AFP isolate dai membri della famiglia delle *Pooideae*, mostra che è stato conservato nelle informazioni genetiche di queste piante un dominio codificante per l'attività d'inibizione della ricristallizzazione del ghiaccio (IRI).

Per spiegare l'evoluzione del dominio che permette di esplicitare l'attività IRI nelle piante, è stata proposta l'ipotesi della presenza di un trasposone (TE) sulla base di sequenze omologhe del dominio LRR con OsPSR, da *Oryza sativa*.

È stato trovato che le regioni di accompagnamento del dominio IRI sono altamente simili a OsPSR, quindi è stato proposto da Tremblay e colleghi nel 2005 che la formazione del dominio IRI sia il risultato dell'inserzione del TE OsLRR-PSR, individuato come recettore chinasi, nella regione codificante del genoma del grano.

Si pensa quindi che il dominio IRI debba essere stato incluso nel corredo genetico delle piante dopo che la famiglia delle *Pooideae* si è separata da quella delle *Pooaceae* durante l'evoluzione.

Considerando questa serie di evidenze nell'insieme, è stato stimato che l'espansione della famiglia di geni per IRI sia avvenuta quasi 36 milioni di anni fa.

Allo scopo di studiare al meglio l'evoluzione delle AFP vegetali, 47 sequenze genetiche delle proteine antifreeze sono state rilevate tramite allineamento, utilizzando il metodo "Clustal Omega".

I risultati dell'analisi hanno mostrato considerevoli differenze tra queste sequenze AFP ed hanno permesso di costruire un albero filogenetico delle proteine antifreeze delle piante, tramite l'istituzione dell'UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

L'albero filogenetico mostra due gruppi principali, definiti cladi.

La formazione di multipli cladi indica la variazione tra le sequenze delle AFP.

Uno dei maggiori cladi con 12 AFP, è formato da AFP provenienti dalla sottofamiglia delle *Pooideae*, contenente il dominio dell'IRI.

E' stato concluso perciò che le varie AFP vegetali si sono evolute in maniera indipendente.

Un'eccezione riguarda le AFP della sottofamiglia delle *Pooideae*, le quali mostrano di essersi evolute da un comune antenato.

CAPITOLO 2:STRUTTURA DELLE PROTEINE ANTIFREEZE

Dettagli riguardanti la struttura di alcune delle proteine antigelo, hanno iniziato ad emergere con l'applicazione di tecniche sofisticate come la risonanza magnetica nucleare (NMR) e la cristallografia a raggi X di alcune proteine di pesce.

Questo ha portato alla costruzione di modelli sempre più dettagliati per descrivere la modalità di adsorbimento del ghiaccio alla struttura proteica. Per riuscire ad esaminare in dettaglio il meccanismo di funzionamento di queste proteine antifreeze, per prima cosa dobbiamo concentrarci sulla caratterizzazione delle strutture in soluzione di queste molecole.

Il primo di questi sistemi che è stato esaminato in maniera approfondita, è una glicoproteina trovata in pesci dell'Antartico.

In questo capitolo inizieremo con l'analizzare la struttura di questa glicoproteina, aggiungendo successivamente dettagli riguardanti la struttura di altre proteine antifreeze.

2.1 GLICOPROTEINE ANTIFREEZE (AFGP)

2.1.1 Struttura primaria

Gli studi iniziali eseguiti tramite l'isolamento e il frazionamento di siero del sangue di *Pathogenia borhgrevinki* e *Disostichus mawsoni* hanno rilevato la presenza di ripetizioni glicopeptidiche.

Il peptide era composto da unità ripetitive di tripeptidi:

alanina-alanina- treonina.

La treonina era a sua volta legata ad un residuo disaccaridico (3-O-β-D-galactosyl- D-N - acetilglucosamina) dove gli zuccheri erano legati in posizione 1-3 (Vandenheede et al. 1972).

Sono state isolate otto frazioni distinte di queste proteine e la maggior differenza consisteva nel numero di ripetizioni tripeptidiche, le quali variavano da 4 fino a 50, con pesi molecolari corrispondenti da 2,7 a 32 kDa (Feeney 1974).

La sequenza C-terminale risultava sempre essere composta dal dipeptide Ala-Ala, tranne per le molecole AFGP estratte da una specie particolare, l'*Eleginus gracilis*, in cui si è dimostrata la presenza al penultimo posto di arginina (Feeney et al. 1986)

2.1.2 Struttura secondaria

De Vries (De Vries et al. 1970) per primo ha determinato che le molecole AFGP non hanno un elevato contenuto in α -eliche.

Tentativi di caratterizzare la struttura secondaria sono stati fatti usando la Spettroscopia Raman (Tomimatsu et al. 1976), il dicroismo circolare sottovuoto (CD), (Bush et al. 1981) e infine la NMR (Bush e Feeney 1986).

La miglior evidenza sperimentale suggerisce che queste glicoproteine esistano in soluzione come tre pieghe elicoidali ad orientamento sinistrorso.

L'unicità di questa conformazione è che, data la presenza delle ripetizioni di triplette permette a tutti i residui saccaridici di essere posizionati sullo stesso lato della molecola, mentre i gruppi di alanina relativamente idrofobici, occupano la posizione primaria sul lato opposto.

Inoltre, Bush e Feeney (1986) hanno ipotizzato, sulla base dei dati di NMR, che i gruppi disaccaridici siano ripiegati verso la struttura amminoacidica così da formare un lato idrofilico stabile, in grado di costituire legami idrogeno e di interagire con la superficie del ghiaccio.

Un recente studio in NMR da parte dello studioso Mimura (Mimura et al. 1992), basato sull'osservazione di glicopeptidi modello, indicherebbe che il residuo di GalNAc forma un legame idrogeno tra il protone del suo gruppo amminico NH e l'ossigeno del gruppo C=O del residuo di treonina, fissando la struttura saccaridica contro la catena proteica.

Lo scienziato ha concluso affermando che questo legame può essere un valido modello per l'interazione tra disaccaridi e peptidi anche nelle molecole AFGP.

Recenti dati da CD e NMR ottenuti dallo studioso Filira (Filira et al. 1990), suggeriscono che il contenuto in strutture ad elica delle AFGP deve essere veramente piccolo, almeno alla temperatura di 25°C.

Questo è coerente con i risultati di Rao e Bush (1987) i quali hanno messo in evidenza che una conformazione che ha solo tre residui per elica non può essere molto stabile.

Grazie alla banda molto intensa a 1684 cm^{-1} corrispondente ad un gruppo amidico di tipo I, Drewes e Rowlen (1993) hanno ipotizzato che nella struttura portante del glicopeptide esista piuttosto un motivo a γ elica.

Benché questa conformazione sia più stabile, suggerisce comunque un diverso meccanismo d'azione, perché in questo modello scompare la struttura con i due lati idrofilico -idrofobico.

Gli autori però ipotizzano che probabilmente più legami idrogeno lungo la catena del polimero potrebbero cooperare tra loro ed avere forza sufficiente per alterare la superficie del cristallo di ghiaccio così che le molecole di acqua non possano ordinarsi efficacemente su di essa.

2.1.3 Struttura terziaria

La prima caratterizzazione della struttura terziaria delle AFGP è stata condotta da Ahmed e colleghi (Ahmed et al.1975).

L'obiettivo era quello di vedere se queste molecole cambiavano la loro dimensione e forma raffreddandole gradualmente fino alla loro temperatura funzionale.

Studi svolti con la Quasi Elastic Light Scattering (QELS) su AFGP hanno mostrato che sia a 22° che a $-0,2^\circ\text{C}$ la struttura della molecola è estesa e bastoncellare.

E' stato visto che anche il raggio idrodinamico cambia di poco, indicando che ci sono piccole variazioni di dimensione nel range di temperatura studiato.

2.2 PROTEINE ANTIFREEZE DI PRIMO TIPO (AFP I)

2.2.1. Struttura primaria

L'esistenza di queste proteine senza residui glucosidici è stata descritta per la prima volta da Duman e De Vries (1974) e poi da Hew e Yip (1976).

La specie studiata più estesamente viene dalla sogliola invernale *Pseudopleuronectes americanus*.

Queste AFP sono ricche in Alanina (65 mol %) come le AFGP.

Sono stati isolati due componenti maggiori utilizzando il metodo dell'HPLC.

Essi sono :

HPLC-6: DTASDAAAAAALTAANAKAAAELTAANAAAAAATAR

HPCL- 8 : DTASDAAAAAALTAANAKAAAKLTADNAAAAAATAR

Come si può vedere, la sequenza è altamente conservata e permette di condurre degli studi di mutagenesi.

Wen e Laursen(1992) hanno recentemente mostrato che l'arrangiamento sistematico dei residui di treonina, asparagina e aspartico in analoghi sintetici del modulo HPCL-6 comporta una perdita da moderata a totale della proprietà antifreeze.

Questi autori concludono inoltre che il rapporto di asparagina/aspartico ha notevole importanza nel definire le funzioni antifreeze probabilmente al pari del contenuto di treonina.

2.2.2. Struttura secondaria

Ananthanarayanan e Hew (1977), Raymond e colleghi (Raymond et al.1977,) hanno determinato indipendentemente che le AFP della sogliola hanno predominanza di α -eliche nella loro struttura secondaria e che questa percentuale cresce fino a oltre l'85% quando si arriva alla T funzionale di -1 °C.

Yang e collaboratori (Yang et al.1988) hanno ottenuto per primi dei dati di diffrazione a raggi X di questa proteina, mostrando che i residui implicati nel legame al ghiaccio sono localizzati su un lato della molecola, mentre i residui di alanina non polari si trovano principalmente sul lato opposto. In ogni caso gli autori non sono riusciti ad identificare sulla proteina dei possibili siti in grado di interagire con le facce prismatiche (a) o basale (c) dei cristalli di ghiaccio.

2.2.3. Struttura terziaria

In uno studio recente condotto da Sicheri e Yang (1995) la struttura cristallina ai raggi X della HPLC -6, rivela che ci sono quattro ripetizioni di amminoacidi leganti il ghiaccio.

Le catene laterali di questi amminoacidi sono naturalmente rigide o rese tali da interazioni con catene vicine, formando così una superficie di legame piana.

2.3 PROTEINE ANTIFREEZE DI SECONDO TIPO (AFP II)

2.3.1. Struttura primaria

Una delle proteine di secondo tipo più studiate proviene dallo scorfano di mare *Hemitripterus americanus*.

Altri tipi di AFP di secondo tipo sono stati trovati in insetti da Patterson e Duman (1982) e nei nematodi dei germogli dell'abete rosso da Hew e colleghi (Hew et al.1983).

Più recentemente, Ewar e Fletcher (1990) hanno isolato e caratterizzato la struttura primaria di proteine antifreeze da sperlano (*Osmerus mordax*) e dall'aringa atlantica (*Cuplea harentus harengus*).

Le masse molecolari di queste ultime due proteine sono 24 e 14,6kDa rispettivamente, caratteristica che le rende tra le più grandi molecole AFP.

Anche quelle di scorfano di mare hanno peso molecolare di 14-16kDa.

La caratteristica principale di queste AFP è che sono ricche in cisteina (da 8,3% mol per quella di scorfano fino a 9,1 mol % per quella di aringa atlantica).

Sebbene l'alanina sia ancora un aa dominante (più del 14,4% per la proteina purificata dall'aringa atlantica) ci sono una serie di altre componenti amminoacidiche altrettanto importanti, incluse Asparagina (Asn), Treonina (Thr) e Glutamina (Gln).

Un'altra caratteristica delle AFP di secondo tipo è la presenza di domini specifici per il legame con il calcio.

Sulla base dei loro legami con il calcio, requisiti per la loro attività, queste proteine anti-gelo possono essere classificate in ulteriori due sottotipi.

Le proteine antifreeze di secondo tipo rilevate nell'aringa e nella famiglia degli osmeridi, sono completamente dipendenti dalla presenza di calcio per l'attività.

Sostituendo il calcio con altri ioni metallici bivalenti come zinco, bario, magnesio, non decresce l'attività antifreeze ma avvengono delle marcate alterazioni nella morfologia dei cristalli di ghiaccio.

L'interpretazione più ovvia è che il calcio sia direttamente implicato nella formazione del legame con il ghiaccio, allo stesso modo in cui esso può mediare il legame tra lo zucchero e le lectine di tipo C.

In contrasto l'AFP di secondo tipo isolata nello scorfano dell'Oceano Pacifico del Nord e dell'Oceano Atlantico, è completamente calcio-indipendente quindi non ci sono amminoacidi legati al calcio.

È più attiva rispetto al sottotipo ritrovato nell'aringa e produce dei cristalli di ghiaccio con morfologia significativamente differente.

Per l'AFP di scorfano di mare l'abbassamento della T di congelamento, alla concentrazione di 5 mg/ml, è circa pari a 0,5°C.

Le AFP di aringa atlantica e sperlano, invece, hanno un'attività significativamente più bassa nella diminuzione della T di congelamento. L'attività antifreeze di tutte queste AFP di secondo tipo è ridotta dalla presenza del ditiotreitolo, indicando l'importanza dei legami di-solfuro nel mantenimento dell'integrità strutturale necessaria al funzionamento.

2.3.2 Struttura secondaria e terziaria

Contrariamente al primo tipo di molecole AFP, c'è un'assenza significativa di contenuto di α -eliche in queste proteine.

Sonnichsen e colleghi (Sonnichsen et al.1995) riportano che per le AFP dello scorfano, c'è il 18% di α -eliche, il 38% di β - foglietti e il 44% di struttura random.

I dieci residui di cisteina, sono tutti probabilmente coinvolti in legami disolfuro.

Uno studio dettagliato di questi legami da parte di Ng e Hew (1992), conferma la presenza di almeno tre legami disolfuro ma non esclude la presenza di altri due nella struttura.

Un recente modello proposto da Sonnichen e colleghi (1995) indica che la regione della catena primaria che viene esposta all'ambiente acquoso attraverso i ripiegamenti dettati dai legami disolfuro, è composta principalmente da residui idrofilici dominati da treonina, asparagina e glutammina, ciascuna delle quali è capace di formare legami idrogeno. Tale ruolo dei ponti disolfuro rafforza l'idea che questi legami sono necessari per mantenere sia la stabilità strutturale che l'attività biologica.

2. 4 PROTEINE ANTIFREEZE DI TERZO TIPO (AFP III)

2.4. 1 Struttura primaria

L'AFP di terzo tipo trovata in *Macrozoarces americanus* non è né ricca in alanina e né contiene alcun residuo di cisteina (Hew et al. 1984).

Queste proteine non sono dominate da alcun amminoacido particolare tra i loro 62-66 residui.

Schrag e colleghi (Schrag et al. 1987,) hanno rilevato questo tipo di proteine anche in altri pesci simili dell'Oceano Artico e Antartico.

2.4.2 Struttura secondaria e terziaria

Un recente studio in NMR effettuato da Sonnichen e colleghi (Sonnichsen et al. 1993) ha portato all'evidenza che in soluzione queste proteine di 66 residui hanno un ripiegamento insolito nel quale otto strutture β costituiscono due foglietti (con tre strutture antiparallele ciascuno) e un foglietto con solo due strutture antiparallele.

Inoltre, i tre foglietti sono impacchettati ortogonalmente in un β -sandwich. Queste proteine hanno struttura globulare, quindi il loro meccanismo di legame al ghiaccio potrebbe essere differente da quelli visti in precedenza. Queste proteine hanno un fattore di idrofobicità di 5,0 che è un valore relativamente alto se comparato con quello di altre proteine.

Nonostante questo si riscontrano delle serie, anche se brevi, di catene polari in particolare si creano delle aree idrofiliche tra i foglietti β che potrebbero essere responsabili del legame al ghiaccio.

2.5 NUOVE STRUTTURE RILEVATE NELLE PROTEINE ANTIFREEZE ANIMALI

Molto recentemente, lo studioso Deng insieme ad alcuni collaboratori (Deng et al. 1997), ha descritto una proteina antifreeze detta di quarto tipo, identificata in *Myoxocephalus octodecimspinosis*, pesce della famiglia *Cottidae* diffuso nei mari Asiatici e dell'America del Nord.

L'analisi della sequenza di 108 residui suggerisce che la proteina ha una struttura altamente ricca di α -eliche e che è omologa a diverse apolipoproteine plasmatiche, capaci di legare lipidi, ma è completamente non correlata ad altre AFP.

E' ricca in glutammina e glutammato (26%) ma ha un contenuto minimo di alanina, pari al 10%, che risulta in contrasto con il 60% di alanina riscontrato nelle proteine antifreeze di primo tipo.

Altre APF sono state isolate da uno scarafaggio, *Tenebrio molitor* (Graham 1997) e da una falena *Choristoneura fumiferana* (Tyshenco 1997).

Entrambe le proteine sono piccole (8-9kDa), ricche in treonina e serina e in legami disolfuro.

A basse concentrazioni hanno un'attività specifica da 10 a 100 volte superiore alle AFP dei pesci.

Nonostante la loro similarità, le proteine estratte dallo scarafaggio e dalla falena possono essere comunque considerate due proteine distinte.

La proteina dello scarafaggio è costituita da numerose ripetizioni della stessa sequenza di 12 amminoacidi (CTxSxxCxxAxT).

La distribuzione spaziale della cisteina nell'AFP di falena, evidenzia sostanziali differenze rispetto a quella dello scarafaggio.

Non esistono infatti lunghi tratti identici di sequenza amminoacidica tra le due proteine.

2.6 STRUTTURA E SITI DI LEGAME DELLE AFP VEGETALI

Dopo la pubblicazione del primo report sulle AFP e AFGP vegetali nel 1992, esse sono state rilevate in più di 60 specie e sono state purificate da 15 di queste.

Alcune AFGP sono state isolate da cinque piante, incluse: *Solanum dulcamara* (Duman 1994), *Daucus carota* (Smallwood et al.1999), *Lolium perenne* (Pudney et al.2003), *Ammopiptanthus mongolicus* (Fei et al. 2008), *Hippophae rhamnoides* (Gupta e Deswal 2012).

Per indagare il ruolo degli zuccheri nel legame con il ghiaccio, le AFGP di *S. dulcamara* sono state sottoposte a trattamenti con periodato e borato, che hanno portato alla perdita dell'attività antifreeze di queste proteine, suggerendo il ruolo delle frazioni zuccherine nel legame al ghiaccio.

Secondo Duman (Duman 1994) anche il trattamento delle SdAFGP con β -galattosidasi o con le lectine di *Abrus precatorius*, risulta nella perdita dell'attività, suggerendo il ruolo centrale del galattosio nell'attività antifreeze delle SdAFGP.

Tuttavia, Gupta e Deswal hanno notato che in alcune piante esistono AFGP le quali non richiedono una frazione zuccherina per svolgere l'attività di isteresi termica, ma esibiscono comunque livelli simili di attività antifreeze se confrontate con AFGP che ne necessitano (Gupta e Deswal 2012).

Le AFP e le AFGP per incorporarsi all'interno dei cristalli di ghiaccio, contengono nella loro struttura una superficie piana che può interagire con i diversi lati di crescita dei cristalli stessi.

Servendosi dell'indice GRAVY gli studiosi hanno misurato l'idropatia degli amminoacidi, la quale è una proprietà importante per prevedere la capacità di legare cristalli di una proteina.

Ventisette delle sequenze proteiche analizzate mostravano un ottimo indice GRAVY, suggerendo di poter essere utilizzate nell'analisi di cristallografia a raggi X per studiarne i dettagli strutturali.

Le analisi riguardanti i dettagli strutturali di alcune AFP vegetali, mostrano che queste proteine sono ricche in conformazioni a β -foglietto.

Infatti, anche la FT-IR (Fourier Transform-Infrared Spectroscopy) applicata da Pudney e colleghi (Pudney et al.2003) alle AFP di *Lolium perenne* (LpAFP), mostra che esse possiedono un inusuale tipo di struttura secondaria di alto livello a β -foglietto.

Allo stesso modo gli spettri di dicroismo circolare delle AFP del grano invernale, di *Ammopiptanthus mongolicus* e di Olivello spinoso, che sono

chitinasi di classe I, hanno dimostrato che queste proteine antifreeze erano ricche di conformazioni a β -foglietto

In particolare le AFP ricavate da *A. mongolicus* sono composte dall'11% di α - eliche, dal 34% di β -foglietti antiparalleli e dal 55% di conformazioni random.

Il motivo di questa prevalenza di β -foglietti è che si tratta di strutture relativamente piane e quindi forniscono una superficie più adatta per legare il ghiaccio.

Nel 2001 è stato proposto il primo modello teorico sulle AFP vegetali dallo studioso Kuiper e suoi colleghi (Kuiper et al.2001).

Grazie a tale contributo, è stato ipotizzato che le LpAFP abbiano β -foglietti in posizione sinistrorsa, supportati da un centro idrofobico di valina e due residui interni di asparagina, legati ad entrambi i siti della struttura.

In questo modello sono presenti due facciate piane opposte per il legame al ghiaccio, le quali hanno conservato alcuni residui di asparagina e sono state proposte essere complementari al piano prismatico dei cristalli, suggerendo così la possibilità che vi sia un legame univoco tra le LpAFP e il piano prismatico del ghiaccio.

Tali facciate sono state definite rispettivamente siti a e b dallo studioso Middleton (Middleton et al.2009).

Una serie di studi mutazionali, hanno affermato la presenza dell'asparagina nei siti di legame al ghiaccio per le AFP delle carote (DcAFP).

Secondo il ricercatore Zhang e colleghi, (Zhang et al. 2004) la sostituzione di residui di asparagina di DcAFP con valina o glutammina risulta in una significativa perdita di attività d'isteresi termica, mentre un incremento di questo parametro è stato osservato quando la fenilalanina o la treonina sono state sostituite dall'asparagina.

Altri studi mutazionali portati avanti da Middleton e colleghi (Middleton et al. 2009) hanno rivolto l'attenzione verso il ruolo dei siti a e b delle LpAFP nel legame al ghiaccio.

E' stata introdotta in questa occasione una singola mutazione nel legame a, che ha causato la sostituzione dei residui di asparagina sul lato corto di LpAFP con tirosina.

Questo evento diminuisce quasi del 90% l'attività TH totale.

All'incontrario la stessa mutazione introdotta nel sito b ha avuto un effetto minore.

Si può concludere che solo il lato a è pienamente coinvolto nel legame al ghiaccio. Recentemente, usando la cristallografia a raggi X, è stato osservato che le LpAFP legano sia il piano prismatico e che quello basale del cristallo di ghiaccio, similmente alle AFP iperattive (Middleton et al 2012).

Si pensa che l'abbassamento dell'attività TH delle AFP vegetali rispetto alle AFP iperattive, possa essere dovuto alla presenza di siti di legame al ghiaccio non sempre costanti, contenenti treonina, serina, valina.

Questo aspetto le differenzia dalle AFP iperattive, le quali contengono due file di residui di treonina allineati.

Tuttavia, è stato evidenziato che ci sono AFP vegetali con attività antifreeze ad alte TH.

Jarzabeck e colleghi hanno verificato le AFP provenienti dalle specie *Picea*, possiedono una TH vicino a 2°C ad una concentrazione di 400 µg/ml (Jarzabeck et al. 2009).

Altra ricerca sulla segale invernale è stata svolta dallo studioso Hon e colleghi (Hon et al. 1995).

Gli autori hanno osservato un accumulo nell'apoplasto di una serie di proteine di dimensioni che vanno da 13 a 36kDa e che presentano attività d'isteresi termica e d'inibizione della ricristallizzazione.

L'analisi delle sequenze N-terminali, immunoblotting e test enzimatici identificano le proteine antifreeze di queste piante come omologhe delle Pathogenesis Related (PR) proteins, quali chitinasi, endoglucanasi e proteine taumatina simili.

Si suppone quindi che queste proteine siano state coinvolte indipendentemente nell'evoluzione di parecchie linee di piante superiori.

CAPITOLO 3: MECCANISMO DI FUNZIONAMENTO DELLE AFP

E' già stato riportato nei precedenti capitoli che esistono essenzialmente due famiglie di proteine, con la capacità di deprimere la temperatura di congelamento.

Sono le glicoproteine antifreeze (AFGP) e le proteine antifreeze (AFP).

In questo capitolo si discuterà approfonditamente del meccanismo di funzionamento che caratterizza queste molecole biologiche.

Le osservazioni meglio documentate sul loro funzionamento sono le seguenti:

1) Nonostante ci sia sempre un effetto sull'abbassamento della T di congelamento dovuto a queste proteine, la temperatura di fusione per il ghiaccio che si forma al di sotto di questa temperatura limite è sempre vicina a 0°C.

Questa disparità tra la temperatura di fusione e la temperatura di congelamento è chiamata isteresi termica.

L'esistenza di questa isteresi, indica che il meccanismo non è colligativo, cioè non dipende solo dalla concentrazione delle molecole coinvolte, ma anche dalla loro composizione.

2) Il livello di attività non colligativa è alto.

In alcuni casi la capacità di abbassamento della temperatura di congelamento è anche 500 volte superiore rispetto a quella dei sali, che invece agiscono secondo le proprietà colligative.

In tutte le specie di proteine antifreeze, sembra che ci sia una concentrazione asintotica alla quale l'attività è saturata.

3) Quando la temperatura di raffreddamento della soluzione supera il livello minimo di protezione generato dalle proteine AFP, la crescita e la morfologia dei cristalli di ghiaccio differiscono significativamente da quelli che si sviluppano in acqua pura.

Avremo quindi cristalli bipiramidali e strutture aghiformi, invece delle classiche strutture a foglietto.

L'esistenza di diverse morfologie di cristallo anche dopo il superamento della temperatura di congelamento, fa supporre che le proteine AFP e AFGP svolgano una funzione anche al di là del semplice abbassamento della temperatura di congelamento.

In ogni caso queste osservazioni sottolineano l'esistenza di un meccanismo di interazione tra le proteine e la superficie dei cristalli di ghiaccio.

4) Anche l'effetto di queste proteine e glicoproteine sulla velocità di crescita dei cristalli è significativo.

Inoltre quando si verifica il fenomeno della ricristallizzazione, la presenza di concentrazioni anche molto basse di AFP in soluzione (10^{-8} M) sembra avere un pronunciato effetto di rallentamento nel tasso di ricristallizzazione.

5) Tra le diverse classi proteiche, è stato osservato un effetto cooperativo. Quando la morfologia del ghiaccio è sfavorevole perché le molecole di AFGP più corte possano essere attive nella prevenzione della crescita del cristallo, è stato riportato che la presenza di specie di AFGP lunghe può facilitare la piena funzionalità anche delle specie corte, dando il via ad una collaborazione tra specie sulla superficie del ghiaccio.

Al contrario, non sono mai stati osservati degli effetti sinergici tra AFP e AFGP.

3. 1 MECCANISMO D' AZIONE

Tutti gli autori sono concordi nell'affermare che il lato di legame con il ghiaccio è piano.

Lo spazio dei residui leganti il ghiaccio corrisponde alla spaziatura delle molecole d'acqua all'interno del ghiaccio stesso.

Alcuni dei presunti residui leganti hanno però una limitata accessibilità al solvente, sebbene questo non limiti completamente la flessibilità delle loro catene laterali in soluzione.

I modelli meccanici ricadono tipicamente in due campi d'interpretazione, distinti essenzialmente in base al ruolo stabilizzante dei legami idrogeno interni.

Alcuni scienziati sostengono che i legami idrogeno con il ghiaccio sono i più importanti contribuenti al corretto funzionamento delle proteine antifreeze.

Altri invece suppongono che sia più importante il contributo entalpico ed entropico aggiuntivo da parte dei residui idrofobici.

Wierzbiki e collaboratori (Wierzbiki et al.1996),confrontando i meccanismi di azione delle diverse AFP di I tipo,sono giunti alla conclusione che"il meccanismo di legame al ghiaccio è fondato sul riconoscimento enantioselettivo della superficie del cristallo,basato sia sull'adattamento dell' α -elica alla topologia della superficie,sia alla coordinazione delle catene laterali dei residui carichi o polari con molecole d'acqua in specifiche posizioni sulla superficie del ghiaccio".

3.2 TEST SPERIMENTALI SULLE IPOTESI D'INIBIZIONE DELLA NUCLEAZIONE

Sono stati svolti alcuni esperimenti per verificare se le ipotesi riguardanti la capacità delle AFP e delle AFGP di inibire la nucleazione del ghiaccio potevano essere validate.

Per testare la capacità di inibizione di nucleazione,è innanzitutto necessario essere sicuri che non siano già presenti dei nuclei nella soluzione da testare. Inoltre è necessario distinguere i casi di nucleazione omogenea (che avviene in soluzione pura e con una energia di attivazione più elevata,quindi a temperature inferiori) o eterogenea (che avviene in presenza di impurità, con una energia di attivazione più bassa).

3.2.1 Nucleazione Omogenea

Lo studioso Franks (Franks et al. 1987) per produrre un sistema privo di nuclei, ha emulsionato le soluzioni in olio di silicone, producendo delle goccioline con raggio di circa 2.5 μ m.

Queste goccioline hanno dei volumi così piccoli da non contenere tracce apprezzabili di impurità che possano fungere da nucleatori.

La temperatura di nucleazione omogenea dell'acqua in queste condizioni è stata di 232,1°K.

L'introduzione di soluti come AFGP e polivinilpirrolidone (PVP) all' 1% w/w non è stata in grado di abbassare la temperatura di nucleazione per non più di 0,2°K.

Questo risulta essere un valore al limite dell'errore sperimentale.

E' stato concluso perciò che le AFGP non sono più efficaci di PVP nel prevenire

la formazione di un nucleo critico di ghiaccio per iniziare il processo di nucleazione .

Wilson e Leader (1995) suggeriscono che ciò sia dovuto alla dimensione molto piccola degli embrioni di cristallo (in questa fase paragonabile a quella delle proteine stesse), tanto che lo spazio sulla loro superficie è insufficiente perché le proteine si possano legare ed esplicare il loro effetto.

3.2.2 Nucleazione Eterogenea

Uno studio sulla nucleazione eterogenea richiede che le impurità che fungono da siti possano essere identificate ed introdotte in maniera controllata.

Wilson e Leader (1995) hanno testato la possibilità che le AFGP possano inibire i siti di nucleazione eterogenea in un sistema che presenta una quantità definita di INA (agenti nucleanti del ghiaccio).

Gli autori hanno lavorato tenendo le soluzioni in capillari molto sottili, in modo che le pareti abbiano pochi siti di nucleazione. In queste condizioni, in assenza di INA, l'acqua può essere portata fino a -20°C senza congelare.

Gli autori hanno confrontato il punto di super raffreddamento (SCP) della soluzione in presenza di INA da *Hemideina maori*, che risultava essere pari a $-7,3^{\circ}\text{C}$, con lo stesso parametro di una soluzione che presentava una miscela di AFGP 1-5, per la quale è stato ottenuto un valore corrispondente a $-9,4^{\circ}\text{C}$.

E' stato verificato in questo modo che la miscela di AFGP "avvelena" il sistema, impedendo ai siti di nucleazione di formare cluster di cristalli sufficienti per permettere la crescita spontanea dei nuclei di ghiaccio.

Hew e Yang (1992) attraverso ulteriori verifiche sperimentali hanno cercato di comprendere meglio il meccanismo d'azione di queste molecole AFGP sui siti di nucleazione dei cristalli.

E' stato osservato che le INA hanno delle facce piane in grado di interagire con il ghiaccio. Queste strutture planari sono costituite da unità ripetute che hanno simmetria esagonale, per cui si è ipotizzato che si leghino alla faccia basale del cristallo, favorendo la crescita di quella prismatica.

E' concepibile che le AFGP interagiscano con le INA, e in questo modo i loro gruppi disaccaridici andrebbero a interferire con il legame alla superficie del ghiaccio.

3.3 TEST SPERIMENTALI SULLE IPOTESI D'INIBIZIONE DELLA CRESCITA DEI CRISTALLI

Moltissimi esperimenti hanno evidenziato la capacità delle proteine antifreeze per quanto riguarda l'inibizione della crescita dei cristalli.

3.4 STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DELLE AFGP

3.4. 1 Inibizione della Crescita del Ghiaccio su facce Specifiche

E' stato verificato che, in presenza di AFGP, non c'è crescita dei cristalli nel range di temperatura che va da 0 a $-0,8^{\circ}\text{C}$ quindi in questo intervallo avviene il fenomeno dell'isteresi termica.

Raymond e De Vries (1972) hanno appurato che scendendo ancora con la temperatura i cristalli sono ancora in grado di crescere, ma con morfologia differente rispetto ad un sistema composto da ghiaccio e acqua pura.

King e colleghi (Knight et al. 1984) sono stati i primi a dimostrare che i cristalli di ghiaccio cresciuti in soluzioni contenenti AFGP si sviluppano sotto forma di aghi che crescono sulla superficie dei cristalli già esistenti, sviluppandosi in direzione perpendicolare rispetto alla faccia basale del cristallo.

Questi esperimenti hanno permesso di osservare in che modo le AFGP influenzano sia la morfologia dei cristalli che l'orientamento della loro crescita.

Negli esperimenti svolti da Harrison e collaboratori (Harrison et al. 1987), è stato studiato lo sviluppo dei cristalli sulla superficie di nuclei preformati portati a diverse temperature di raffreddamento.

E' stata notata una forte correlazione tra il tasso di crescita, il livello di raffreddamento e la concentrazione di AFGP nei campioni contenenti la soluzione.

In particolare l'inizio del fenomeno di crescita durante il raffreddamento è evidenziato dalla rapida comparsa di strutture aghiformi che si sviluppano lungo l'asse c.

Abbassando ulteriormente la temperatura o diminuendo la concentrazione di proteina la crescita diventa invece sempre più simile a quella dei cristalli in acqua pura.

Queste differenze nella crescita dei cristalli sono attribuite a legami selettivi delle AFGP a specifiche facce della superficie del ghiaccio.

Knight e De Vries (1994) hanno utilizzato un approccio diverso, facendo sviluppare un grande cristallo in una soluzione contenente AFGP.

Una volta rimosso il cristallo dalla soluzione, esso è stato tagliato in diverse sezioni, che sono poi state evaporate e su queste è stato determinato il contenuto di proteina (precedentemente marcata con trizio).

Si è evidenziato che le superfici con apparenza eterogenea sono influenzate dal legame con le proteine, mentre le facce senza adsorbimento si mostrano vitree e lisce, si evince quindi che:

a) i piani prismatici hanno un forte adsorbimento;

b) i piani basali sono essenzialmente liberi dalle proteine.

Di conseguenza verrà limitata la crescita del lato prismatico dei cristalli, mentre sarà favorito lo sviluppo del piano basale degli stessi.

3.4.2 Copertura quantitativa della facciata di crescita

Vesenka e collaboratori (Vesenka et al. 1993) hanno utilizzato la tecnica della Quasielastic light scattering per vedere se c'era la possibilità di misurare il numero di AFGP presenti su una particolare facciata di crescita.

È stato verificato che le proteine adsorbite potevano essere quantificate rilevando la modificazione della forza del segnale luminoso proveniente dalle microbolle, presenti all'interfaccia tra il ghiaccio puro e l'acqua.

Questa tecnica è molto sensibile e rileva anche bassi livelli di concentrazione delle soluzioni AFGP (50 µg/ml).

Si è visto così che le proteine tendono ad adsorbirsi circa 80 volte di più sul piano prismatico vicino all'asse a piuttosto che sulla faccia basale.

3.4.3 Ricristallizzazione

Quando campioni contenenti cristalli di ghiaccio vengono mantenuti per un periodo prolungato ad una temperatura di sub-fusione, si osserva che i cristalli cambiano in morfologia e dimensioni.

Questo è il fenomeno della ricristallizzazione.

In questa situazione i cristalli più piccoli sono gradualmente inglobati dai cristalli più grossi, andando a formare degli aggregati di ghiaccio di dimensioni considerevoli.

La forza che guida questo fenomeno è quella della minimizzazione dell'energia di legame totale.

In presenza di sostanze estranee, certi cristalli sono inibiti nella crescita, in particolare a causa dell'alterazione dell'energia di interfaccia.

Si è osservato che concentrazioni anche piccole di AFGP possono influenzare il fenomeno della ricristallizzazione, mantenendo piccole le dimensioni dei cristalli di ghiaccio.

CAPITOLO 4: TECNICHE DI RILEVAZIONE DELLE AFP

L'attività antifreeze può essere quantificata e osservata tramite vari metodi convenzionali come Splat assay, Nanoliter osmometer, Differential Scanning Calorimetry e Capillary assay.

Ogni metodo ha i suoi benefici e inconvenienti, tuttavia le tecniche più utilizzate per determinare l'attività IRI (Ice Recrystallization Inhibition) e la THA (Thermal Hysteresis Activity) sono Splat assay e Nanoliter osmometer. Inoltre, una nuova metodica di rilevazione colorimetrica che impiega nanoparticelle è stata introdotta recentemente e può essere usata per misurare l'attività delle proteine antifreeze.

In questo paragrafo ogni metodo sarà presentato singolarmente, insieme ai relativi vantaggi e svantaggi.

4.1 SPLAT ASSAY

Lo "Splat assay" permette di disporre di strumenti affidabili per la valutazione dell'effetto dei soluti sulla ricristallizzazione del ghiaccio.

È stato osservato che la velocità di crescita dei cristalli di ghiaccio è controllata da tre fattori principali:

- a) la granulometria;
- b) la concentrazione dei soluti;
- c) la temperatura.

Il saggio "Splat" è stato usato per la prima volta da Knight nel 1986.

La tecnica consiste nel sigillare la soluzione da studiare in uno strato di 300 μm compreso tra due vetrini.

Viene quindi permessa prima la nucleazione portando la temperatura da -6 a -8°C e quindi la cristallizzazione tramite un rapido congelamento a -12°C .

La temperatura viene quindi portata a -4°C per 24h per permettere la ricristallizzazione.

La granulometria ottenuta serve per misurare l'effetto dei soluti sulla ricristallizzazione spontanea.

La maggiore difficoltà del metodo consiste nel fatto che esistono due fenomeni contemporaneamente:

- a) la nucleazione di nuovi cristalli;
- b) la loro ricristallizzazione;

A causa dell'incertezza sull'evoluzione della nucleazione, i risultati ricavati dall'analisi sono insoddisfacenti perché non possono essere riprodotti con precisione.

Per superare questo problema, Knight e colleghi (Knight et al. 1988) hanno approfondito la questione ed hanno introdotto una modifica alla tecnica che è stata descritta qui sopra.

Il metodo modificato è conosciuto come "Splat cooling assay".

4.1.1 Splat cooling assay

Questa tecnica consiste nel rilascio di goccioline di soluzione di 10 μ l da 2,6 m su un piatto di alluminio raffreddato a -78°C usandolo immediatamente per minimizzare la formazione di "neve" sulla superficie. Le goccioline si gelano immediatamente dopo aver colpito la superficie metallica, formando un disco di 5 mm di larghezza e 50 μm di spessore, fino e leggermente concavo.

Il disco è coperto con un copri- vetrini ed è trasferito ad un microscopio, trasportandolo con una lama mantenuta a temperature sotto lo zero per evitare lo scongelamento dei cristalli.

La ricristallizzazione del ghiaccio viene quindi osservata per un determinato periodo di tempo, posizionando il dischetto in un piccolo piatto fondo di vetro o polistirene a -8°C e fotografandolo per determinare cambiamenti nella taglia media dei cristalli di ghiaccio.

Il metodo mostra un ingrossamento riproducibile dei cristalli, che fornisce una misura della mobilità dei nuclei di ghiaccio in soluzione e della loro energia di legame alle AFP.

Uno svantaggio di questo metodo è che richiede molto tempo soprattutto per le fasi di preparazione del saggio e per indurre la ricristallizzazione.

Inoltre sono davvero molti i fattori che possono influenzare i risultati e che quindi vanno tenuti accuratamente sotto controllo.

4.1.2 Splat assay modificato:saggio splat a sandwich di saccarosio

Il metodo dello splat assay è stato ulteriormente modificato da Smallwood e collaboratori (Smallwood et al. 1999),ed è stato denominato "Sucrose Sandwich Splat Assay".

I campioni sono inseriti ugualmente tra due copri-vetrini rotondi,congelati rapidamente in 2-2-4-trimetilpentano raffreddato tramite ghiaccio secco e quindi immersi in un altro becker,contenente lo stesso solvente ma incubato a -6°C.

Le immagini digitali di tutti i campioni vengono acquisite subito prima dell'incubazione a -6°C e dopo che i campioni hanno subito la ricristallizzazione.

Il metodo si chiama "Sucrose Sandwich Splat Assay" perché la versione più comune prevede di aggiungere 30% di saccarosio alla soluzione delle proteine.

Il metodo può essere usato anche per analisi semiquantitative per determinare tramite una serie di diluizioni successive la concentrazione minima oltre la quale non si osserva più attività d'inibizione della ricristallizzazione.

4.1.2.1 Vantaggi

Entrambi i saggi " Splat" e " Splat modificato"riescono ad evidenziare l'attività d'inibizione della ricristallizzazione messa in atto dalle AFP.

Il metodo è semplice, facile da usare e non richiede un operatore esperto per maneggiare l'attrezzatura.

Il saggio può essere utilizzato quindi come base per verificare la presenza o l'assenza di AFP nei campioni.

4.1.2.2 Svantaggi

Può essere analizzato solo un campione per volta e non è possibile una comparazione diretta tra i campioni, un confronto si può avere solamente nel momento in cui le immagini del microscopio vengono registrate e quindi analizzate una accanto all'altra.

Inoltre il campione una volta analizzato deve essere eliminato e non può essere riutilizzato (analisi distruttiva).

Infine, come già accennato, è un metodo laborioso e che richiede lunghi tempi di preparazione.

4.2 SAGGIO DI CAPILLARITA'

Tomczak e collaboratori (Tomczak et al. 2003) hanno ideato un efficace saggio per determinare l'attività d'inibizione della ricristallizzazione delle AFP.

Questo metodo è semplice, permette la visualizzazione diretta e la comparazione contemporanea di più serie di campioni nello stesso esperimento.

Inoltre è un'analisi non distruttiva e permette il recupero dei campioni per usi futuri.

L'attività IRI viene determinata usando capillari di vetro da 10µl, entro cui i campioni sono caricati per effetto della capillarità.

I capillari possono contenere diluizioni diverse della stessa AFP anche in diversi tamponi, i diversi tamponi senza proteina come controllo e anche proteine senza attività antifreeze (ad esempio BSA) come controllo negativo.

Diversi capillari possono essere sigillati e allineati per mezzo di una pinza e vengono congelati in soluzione di 2,2,4-trimetilpentano anidro e portato a -50°C tramite ghiaccio secco.

Come per il Sucrose Sandwich Splat Assay, vengono successivamente immersi in un becker riempito con lo stesso solvente e mantenuto a -6°C attraverso un bagno refrigerato circolante e mantenuti in quelle condizioni approssimativamente per 16 h.

Le immagini relative ai cambiamenti di granulometria sono acquisite in due specifici momenti dell'esperienza di laboratorio:

- a) non appena i campioni sono immersi nel bagno refrigerante a - 6°C;
- b) a conclusione dell'esperimento dopo 16 h.

Il metodo permette di analizzare 10-15 campioni simultaneamente, incrementando così la propria applicabilità per una rapida visualizzazione delle AFP raccolte in frazioni differenti di una colonna cromatografica.

In questa metodologia possono inoltre essere utilizzate diluizioni seriali per determinare la concentrazione d'inibizione della ricristallizzazione (RI) delle proteine antifreeze.

4.2.1 Vantaggi

Il metodo capillare ha una serie di vantaggi rispetto allo Splat e al Sucrose Splat Sandwich Assay.

Innanzitutto, come accennato precedentemente, questa tecnica dà la possibilità di visualizzare e analizzare più campioni simultaneamente.

In aggiunta, non richiede nessun speciale e complesso strumento ed i risultati che si ottengono rispecchiano fedelmente i valori ottenuti anche con metodiche più complesse.

Il metodo può essere sfruttato anche per trovare proteine antifreeze in specifiche frazioni di colonna, permettendo quindi d'identificare i picchi che indicano la presenza delle proteine antifreeze in soluzione.

Una volta preparati, i capillari caricati con i campioni possono essere usati in maniera riproducibile per diverse settimane in saggi successivi e possono essere conservati in freezer come riferimento per prove successive.

Infatti grazie a questa metodica è possibile preparare un set di campioni standard contenente AFP che consenta di comparare l'attività antifreeze di proteine di lotti diversi con lo stesso standard di riferimento ogni volta.

4.3 NANOLITER OSMOMETER

Questo strumento è utilizzato per misurare l'attività di isteresi termica e per osservare la morfologia dei cristalli di ghiaccio.

L'attività TH delle proteine antifreeze può essere sfruttata per eseguire analisi quantitative, mentre la morfologia dei cristalli fornisce un'analisi qualitativa dell'attività antifreeze.

Il dispositivo consiste in un box di controllo, un sistema di raffreddamento e un supporto per il campione.

La temperatura della fase può essere aggiustata fino a $-20/-40^{\circ}\text{C}$ con una precisione di $0,01^{\circ}\text{C}$.

Una siringa con capacità di caricamento di volumi dell'ordine dei nanolitri è usata per applicare olio minerale alla base dei pozzetti.

La gocciolina di olio funge da supporto per il campione (pochi nanolitri depositati con un'altra siringa) perché aderisce per tensione superficiale al pozzetto, e contemporaneamente evita la sua dispersione e disidratazione.

Successivamente il disco porta campioni è montato delicatamente su un microscopio a contrasto di fase, dove la temperatura dei campioni è controllata attraverso un dispositivo Peltier.

Il campione in seguito è rapidamente congelato a 20°C .

In questa fase si formano diversi piccoli cristalli di ghiaccio quindi la T è gradualmente aumentata ($0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) per consentire la ricristallizzazione dei campioni fino a che un cristallo singolo non rimane nel pozzetto.

Si applica poi un nuovo decremento graduale della temperatura, per consentire a questo singolo cristallo di crescere.

Il cambiamento della sua morfologia è tenuto sotto osservazione e registrato con un video.

Dopo ogni saggio il disco porta campioni è sciacquato con solvente organico per evitare contaminazione tra un campione e il successivo.

4.3.1 Vantaggi

Siccome anche proteine che non hanno attività di isteresi termica possono influenzare la ricristallizzazione modificando l'adesione delle molecole di acqua sulla superficie del ghiaccio, la misura della sola inibizione della ricristallizzazione può causare artefatti.

Con il nanoliter osmometer invece non viene misurata solo l'isteresi termica, ma anche la ICM (Ice Crystal Morphology) che è un parametro più robusto per la rilevazione delle AFP.

4.3.2 Svantaggi

Può essere necessario effettuare una lunga osservazione dei cristalli ad occhio nudo ad un determinato gradiente di temperatura, con la possibilità di commettere errori di valutazione.

Oltretutto, essa richiede una strumentazione specializzata e personale formato per maneggiare i capillari a nano-litro con precisione.

Inoltre le misure di ICM e THA possono variare a seconda del contenuto in ghiaccio, portando a risultati non riproducibili.

4.4 CALORIMETRO A SCANSIONE DIFFERENZIALE (DSC)

Il calorimetro è la prima tecnica più utilizzata per la misurazione delle proprietà termiche di differenti materiali e quindi per risalire all'entalpia associata ad una determinata sostanza.

I calorimetri differenziali sono stati usati frequentemente per misurare le proprietà termodinamiche delle biomolecole in diversi campi della scienza.

In particolare viene ampiamente utilizzato per misurare le variazioni di entalpia associate a cambiamenti di stato della sostanza in esame quando sottoposta a variazioni di temperatura nel tempo.

Lo strumento ha molteplici applicazioni in bio e nano-scienza, come ad esempio nell'analisi della stabilità termodinamica delle molecole in differenti condizioni, nella determinazione delle modificazioni strutturali durante i cambiamenti di fase, nello studio dei cambiamenti conformazionali delle molecole durante le reazioni, nell'analisi delle interazioni tra molecole diverse, ecc.

4.4.1 Strumentazione DSC

I componenti di base degli strumenti DSC includono:

a) una cella capillare per il campione e una analoga per il riferimento;

b) un sistema di protezione intorno ai capillari per evitare dispersioni di calore e permettere di valutare le variazioni di temperatura nel campione;
c) un sistema di monitoraggio del calore in grado di misurare anche piccolissimi cambiamenti di entalpia tra le due celle;

Nel 1988, gli studiosi Hansen e Baust hanno proposto il Differential Scanning Calorimeter (DSC) per determinare la THA delle AFP.

I campioni (1-5 μl) che contengono soluzioni di AFP, sono stati posti in 20 μl di olio, per prevenire la dispersione di composti volatili e la disidratazione dei campioni stessi durante gli esperimenti di ricristallizzazione.

La BSA, priva di proprietà antifreeze è stata utilizzata come riferimento.

Il campione è stato prima raffreddato da 28 a -15°C alla velocità di $1^{\circ}\text{K}/\text{minuto}$ per permettere il congelamento e poi sottoposto ad un lento riscaldamento a $0,5^{\circ}\text{K}/\text{min}$ per permettere lo scongelamento completo del campione.

L'entalpia di fusione (ΔH_m), il punto di fusione e di congelamento sono stati calcolati tramite la curva ricavata dal DSC.

I campioni quindi sono stati nuovamente sottoposti a congelamento a -15°C , seguito da lento riscaldamento fino ad una temperatura di mantenimento (T_h) che permette la ricristallizzazione.

Conclusa questa prima fase, i campioni sono stati ricongelati in maniera graduale per determinare la temperatura iniziale (T_0) alla quale appare la ricristallizzazione.

L'entalpia rilasciata con il ricongelamento (ΔH_r) e la THA delle AFP, sono state calcolate come differenza tra la temperatura di mantenimento T_h e la temperatura iniziale di ricristallizzazione.

La comparazione tra l'area della curva di congelamento esotermico e quella di fusione endotermica dedotte dalla curva DSC, può essere utilizzata per calcolare la % di ghiaccio presente nei campioni.

È stato proposto da Hassa-Roudsari e Goff (2012) un metodo veloce, semplice e qualitativo, che non richiede un'osservazione intensa dei campioni e permette di usare quantità fino a $1\mu\text{l}$.

In questo metodo l'attività è misurata per un'ora in condizioni isoterme e dal confronto delle curve DSC è possibile verificare la presenza o l'assenza delle AFP.

4.4.2 Vantaggi

La tecnica basata sull'uso del DSC può aiutare nel rilevare un'attività d'isteresi termica fino a 10°C.

E' un metodo che fornisce dei dati qualitativi utili per stimare accuratamente il volume dei cristalli di ghiaccio in soluzione, mentre la normale osservazione microscopica risulta essere insufficiente per quantificare il contenuto di ghiaccio e le variazioni di attività.

4.4.3 Svantaggi

L'analisi DSC richiede maggior tempo per le analisi e comporta procedure e attrezzature complesse, mentre gli altri metodi permettono uno screening rapido.

4.5 NANOBIOLOGIE

Le nanoparticelle differiscono dal materiale di origine dal quale derivano perché le proprietà fisiche, ottiche, magnetiche, elettriche, chimiche, meccaniche dipendono dalla dimensione delle particelle. (Grabar et al.1995).

Le nanoparticelle di oro colloidale cambiano colore in soluzione a seconda della dimensione delle particelle a causa del fenomeno chiamato Surface Plasmon Resonance.

Le particelle si preparano sciogliendo un sale dell'oro in soluzione contenente citrato, il quale riduce il metallo a Au^{3+} formando le nanoparticelle, e contemporaneamente ricopre le particelle stesse conferendo carica negativa, per cui le nanoparticelle si respingono per repulsione elettrostatica e non aggregano.

Questa soluzione assorbe la luce verde a 520 nm per cui la soluzione appare rossa.

La rimozione di queste forze repulsive causa un'aggregazione delle particelle, che così assorbono a 650 nm e conferiscono colorazione blu alla soluzione.

Queste nano-particelle hanno numerose applicazioni in differenti campi, tra cui anche la rilevazione delle AFP.

Un nuovo e rapido metodo ad alta sensibilità basato su un saggio colorimetrico che usa nano-particelle sensibili al congelamento, è stato utilizzato per rilevare l'attività e la stabilità delle AFP.

Il saggio è basato sul cambiamento del colore di una soluzione composta da nanoparticelle di oro, che si verifica per aggregazione delle particelle stesse quando avviene il congelamento.

Questo effetto può essere osservato direttamente ad occhio nudo e quantificato attraverso la misura dell'assorbanza.

L'aggiunta di AFP che agiscono come crioprotettori, previene l'aggregazione delle particelle e permette quindi alla soluzione di mantenere il suo colore originario.

Il metodo è semplice e conveniente ed ha ricevuto particolare attenzione nel campo diagnostico clinico e ambientale.

4.5.1 Vantaggi

Questa tecnica innovativa presenta molteplici vantaggi rispetto ai metodi convenzionali di misurazione della THA.

Il metodo è semplice, conveniente e non richiede lavoro intensivo.

Non mostra particolari difficoltà nello svolgimento delle operazioni, inoltre possiede elevata sensibilità.

Si può aggiungere che è una tecnica più veloce nel rilevare l'attività antifreeze rispetto ad altri metodi, in quanto presenta modalità di screening delle soluzioni quattro volte più rapide.

4.5.2 Svantaggi

Il maggior svantaggio di questa analisi è che a volte può verificarsi l'autoassemblaggio delle nanoparticelle per motivi diversi dal fenomeno della ricristallizzazione.

Allo stesso modo, l'inibizione dell'autoassemblaggio può essere causata anche da altri fattori, con il rischio di rilevare un'attività antifreeze anche in assenza di AFP.

CAPITOLO 5 : APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE DELLE AFP

L'abilità delle AFP nell'influenzare la crescita dei cristalli di ghiaccio e nell'inibire la ricristallizzazione, ha permesso la loro applicazione in una larga varietà di settori.

Esse sono state coinvolte nelle tecnologie alimentari, per migliorare la consistenza e le proprietà dei cibi congelati durante lo stoccaggio refrigerato, riducendo oltretutto la dispersione dei nutrienti causata dalla fase di scongelamento dei prodotti.

Un ulteriore impiego di tali molecole biologiche riguarda il miglioramento, tramite ingegneria genetica, della tolleranza al gelo in vegetali che nell'ambiente naturale ne sarebbero suscettibili.

In questo ambito le proteine considerate agiscono come agenti antigelo nei confronti della linfa.

L'induzione della tolleranza al freddo in organismi originariamente sensibili può avvenire grazie al trasferimento di geni codificanti per queste proteine, come è avvenuto per certi pesci che hanno acquisito tale proprietà consentendone l'allevamento in qualsiasi momento dell'anno in regioni caratterizzate da basse temperature.

Attraverso l'infiltrazione sottovuoto, si può attuare inoltre la crioconservazione delle cellule, dei tessuti, delle linee cellulari e degli organi da trapiantare.

Le proteine antifreeze sono implicate nella distruzione delle cellule affette da cancro tramite crio-chirurgia, portando a risultati dipendenti dal tipo e dalla concentrazione delle AFP utilizzate.

5.1 PRODOTTI ALIMENTARI CONGELATI

La conservazione tramite congelamento è da sempre sfruttata per aumentare la shelf-life di diversi articoli alimentari. (Griffith e Ewart 1995; Feeney e Yeh 1998; Wathen e Jia 2005)

Molteplici processi di congelamento-scongelo portano alla formazione di grandi cristalli di ghiaccio, che possono avere effetti dannosi sulle diverse caratteristiche che definiscono un alimento:

1. la qualità;
2. il volume;
3. la struttura;
4. la consistenza;
5. il contenuto in gas;
6. il contenuto in nutrienti.

Perciò, ottenere le condizioni ottimali di congelamento degli alimenti risulta essere un importante obiettivo da raggiungere per i tecnologi alimentari.

In questo contesto è preferibile applicare il congelamento rapido dei prodotti da conservare.

Questa tecnica infatti, consente di tenere maggiormente sotto controllo la velocità del processo e di portare alla formazione di cristalli di ghiaccio di piccole dimensioni, per minimizzare i possibili danni che questi possono provocare ai tessuti vegetali e animali conservati in regime di congelamento.

Tra le tecniche esistenti per rendere il congelamento efficace e allo stesso tempo non dannoso per la qualità degli alimenti, possiamo citare quella di aggiungere fisicamente al cibo le proteine antifreeze, conosciute anche come proteine strutturanti del ghiaccio (ISP).

Si possono riportare degli esempi in cui le proteine antifreeze sono state ritenute efficaci nel prevenire gli effetti negativi della ricristallizzazione del ghiaccio sugli alimenti.

In tale contesto vengono coinvolte diverse categorie di alimenti, si va infatti dai prodotti lattiero caseari, dove le AFP sono state aggiunte per controllare la formazione dello strato di ghiaccio nel gelato che deve

essere sottile per conservarne la consistenza morbida e cremosa (Warren, Mueller, and Mckown 1992), ai prodotti carnei per i quali si è verificato che immergere la carne in una soluzione contenente le proteine antifreeze di primo tipo nella fase che precede il congelamento, porta alla riduzione dello sviluppo di cristalli intracellulari prevenendo quindi il danneggiamento cellulare e la perdita di nutrienti durante il successivo riscaldamento (Payne, Sandford, Harris, & Young, 1994).

Gli stessi effetti sono stati ottenuti iniettando per via intravenosa le AFGP negli agnelli da 1 a 24h prima della macellazione e sottoponendo la carne a congelamento e confezionamento sottovuoto.

Questo può aiutare nel conservare la carne da 2 a 16 settimane senza incorrere in un'eccessiva perdita delle sue qualità originali di composizione, nutritive e organolettiche.

Inoltre, l'espressione del gene delle ISP nei batteri lattici durante la fermentazione permette l'utilizzo diretto di questi organismi per produrre lo yogurt, il crauto fermentato, i sottoaceti e le salsicce fermentate, senza nessuna necessità di aggiungere AFP modificate negli alimenti stessi.

Sempre in riferimento ai batteri è stata messa in evidenza da alcuni studi svolti da Kozloff, Schofield e Lute nel 1983, l'esistenza di ceppi appartenenti ai generi *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Xantomonas* che possiedono la capacità di accelerare il processo di congelamento alzando la temperatura di nucleazione del ghiaccio ed andando a formare cristalli di piccole dimensioni che non provocano grossi cambiamenti di consistenza negli alimenti, migliorandone la qualità complessiva.

Un'altra ricerca rivolta ad analizzare le potenzialità di questi batteri è stata portata avanti dallo studioso Li e dal collega Lee nel 1998, che hanno preso in considerazione tre sistemi alimentari:

- a) solido: carne macinata;
- b) semi-solido: gelato;
- c) liquido: latte e succo di frutta;

Hanno notato che l'aggiunta di 700 unità di ECIN (nucleanti del ghiaccio extracellulari, ottenuti da *Erwinia ananas*) a 10 mL di soluzione, hanno abbassato la velocità di congelamento, in pratica si raggiunge la temperatura di 6°C in un tempo più breve.

E' stato verificato però che l'aggiunta di questi ECIN influenza maggiormente le temperature di nucleazione di sistemi liquidi e semi-solidi rispetto a quelli solidi.

Gli studiosi hanno inoltre osservato che in assenza di ECIN si formano cristalli lisci, mentre in loro presenza la superficie del ghiaccio tende a diventare irregolare.

Inoltre, l'utilizzo di agenti di nucleazione del ghiaccio batterici può permettere di mantenere la struttura fibrosa richiesta in alcuni alimenti come tofu, carne rossa e carne di pollo.

Uno degli aspetti più importanti da verificare prima di aggiungere questi ceppi agli alimenti è che non siano patogeni, non producano tossine e quindi possano essere considerati sicuri dal punto di vista igienico-sanitario.

Tornando a parlare delle proteine strutturanti del ghiaccio (ISP), esse possono essere impiegate anche nel miglioramento della qualità degli impasti congelati usati nell'industria panettiera per incrementare la velocità di formazione del gas e la produzione di gas totale in dolci congelati.

Le AFP concentrate provenienti dalle carote, hanno mostrato alcuni benefici effetti sulla qualità dell'impasto mantenendo il volume della pagnotta e migliorandone la sofficità, anche se lo stoccaggio refrigerato causa sempre la perdita di una certa quantità di acqua congelabile.

Queste proteine non provocano nessun effetto negativo sui componenti volatili.

Le ISP provenienti dal grano invernale riducono il deterioramento strutturale e aumentano le proprietà meccaniche del reticolo glutine-ghiaccio tramite l'inibizione della ricristallizzazione, inducendo la diminuzione del punto di congelamento e la decrescita della quantità di acqua congelabile. (Kontogiorgos, Goff, & Kasapis, 2007; Xu *et al.*, 2009)

Si è osservato, con l'introduzione di AFP ricombinate del pesce polare *Mixocephalus aeneus* nei ceppi di lievito in pasta *Saccharomyces cerevisiae*, un aumento della tolleranza al freddo tramite la riduzione del danno osmotico durante il processo di congelamento-scongelo della pasta.

Questa serie di evidenze conferma il grande interesse nell'applicare le AFP agli alimenti.

Tuttavia, il numero effettivo dei casi che riportano l'impiego di queste macromolecole nella conservazione dei prodotti surgelati oggi giorno è esiguo.

Ciò è dovuto principalmente al fatto che questa nuova applicazione risulta essere onerosa dal punto di vista economico per le industrie alimentari anche se i tecnologi alimentari sono consapevoli del fatto che le proteine antifreeze possono fornire maggiori opportunità nella gestione della fase di conservazione degli alimenti poiché possono controllare la struttura e la dimensione del ghiaccio.

Riescono inoltre a prevenire le perdite di qualità dovute al deterioramento dei prodotti, ridurre il danno cellulare e la perdita di nutrienti.

E' stato constatato che diverse ISP ricavate da alcune parti edibili di organismi vegetali e animali, sono commestibili e quindi possono rientrare con sicurezza come parte della dieta umana.

5.2 PIANTE TRANSGENICHE

L'espressione transgenica delle AFP di I tipo è stata eseguita per la prima volta in piante di patata, di pomodoro e di tabacco.

L'infiltrazione sottovuoto delle foglie di patata è stata in grado di indurre tolleranza al freddo in questi vegetali.

I pomodori transgenici che esprimono geni codificanti per le AFP, mostrano un miglioramento nel tollerare il freddo e nell'inibire la ricristallizzazione.

In alcuni casi le AFP trasferite falliscono nell'incrementare la tolleranza al freddo e ciò potrebbe essere dovuto:

a) all'assenza di enzimi adatti a convertire le proteine nelle loro forme attive;

b) a causa della troppo bassa concentrazione della proteina desiderata negli organismi transgenici;

L'espressione del gene codificante per le AFP di carota in *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, ha portato queste ultime a diventare delle

piante transgeniche che mostrano l'accumulo di proteine ad attività antifreeze e tolleranza al freddo (Worral et al.1998).

Lo stesso fenomeno è avvenuto in *Arabidopsis thaliana* trasferendo nel suo corredo cromosomico il gene codificante per una proteina antifreeze d'insetto (Huang et al.2002).

Le proteine AFP presenti in pesci e insetti sono caratterizzate da un'elevata attività d'inibizione della ricristallizzazione(IRI),quindi se inserite nelle coltivazioni possono portare a vantaggi notevoli per quanto riguarda le possibilità di difesa dei vegetali dagli effetti del gelo.

5.3 INGEGNERIA GENETICA DELLE AFP

Una delle più ovvie applicazioni delle AFP è di introdurle in specie diverse dalle originali, che non possono in natura usufruire di questa protezione. L'idea è di introdurre queste proteine attraverso la manipolazione genetica.

Da questa ipotesi, il DNA e la struttura genetica dei differenti tipi di AFP sono stati caratterizzati dallo studioso Davies e colleghi nel 1997.

Fletcher e Davies hanno con successo inserito uno specifico gene di sogliola invernale nel salmone antartico.

L'espressione del gene della AFP nel salmone transgenico, trascorso un periodo di 5 anni, mostra che il salmone può esprimere in proprio il gene della sogliola invernale inserito, confermato ulteriormente dal fatto che secerne il regolatore pro- AFP nel sangue.

Finora, però, nel sangue non è stato rilevato il sistema enzimatico necessario per processare questo precursore in molecole AFP mature.

Nelle regioni fredde l'acquacoltura di alcuni pesci commerciali durante l'inverno è veramente difficoltosa, poiché non sono abili a sopravvivere al freddo estremo e tendono a migrare.

Il problema può essere risolto generando pesci tolleranti a questo tipo di clima.

Un esempio concreto è la trota iridea che è stata trasformata in una specie tollerante dopo il trasferimento di un gene codificante per le AFP di primo tipo della sogliola invernale.

Ciò può aumentare la sua capacità di sopravvivere, anche a valori di temperatura di congelamento pari a $-1,4^{\circ}\text{C}$.

5.4 CRIOCONSERVAZIONE DI TESSUTI E ORGANI

5.4.1 Ovociti e embrioni

Alcuni studi hanno dimostrato gli effetti crioprotettivi delle AFP su vari tessuti e organi.

Il ruolo delle AFP nella conservazione di cellule di mammifero è stato per la prima volta osservato da Arav, nel 1993.

Arav ha dimostrato inoltre che le AFP sono efficaci nel proteggere gli oociti dai danni del congelamento - scongelamento.

Rubinsky nel 1991 ha anche riportato che il congelamento di fegati di mammifero con glicerolo e AFP permette di raggiungere un livello aggiuntivo di crioprotezione.

Questi risultati suggeriscono che la possibile interazione tra AFP e AFGP con le membrane avviene in modo più complicato rispetto a quando si comportano come semplici elementi crioprotettivi.

Il trattamento di ovociti di suino durante la surgelazione con alcune delle quattro AFP del pesce, ha portato all'incremento della sopravvivenza cellulare del 75% dopo lo scongelamento.

Gli oociti non trattati invece sono stati incapaci di sopravvivere al congelamento.

Recentemente sono state utilizzate delle AFP di secondo tipo a concentrazioni più basse di 50 ng/ml per permettere la surgelazione di vescicole immature in fase germinale di oociti di topo e hanno mostrato di promuovere la resistenza alla lesione degli stessi dopo lo scongelamento, incrementando la sopravvivenza, la maturazione in vitro, la fertilizzazione e lo sviluppo embrionico oltre lo stadio di blastocisti.

L'aggiunta di AFP ha migliorato inoltre l'integrità delle membrane e ha favorito il mantenimento di una morfologia cromosomica normale in una maggiore porzione di oociti rispetto a quelli non trattati.

Lo studioso Paramo nel 2008 riporta l'uso di AFP per la crioconservazione di embrioni di pesce, difficili da refrigerare a causa della loro sensibilità al

congelamento e alla complessa struttura cellulare caratterizzata da compartimenti multipli e barriere permeabili.

Per studiare più approfonditamente queste sostanze biologiche, il primo e il terzo tipo di proteine AFP, sono stati introdotti in embrioni di Pesce Zebra ai primi stadi di sviluppo tramite inoculazione e valutati con microscopio confocale a fluorescenza.

Il metodo appena descritto è semplice, veloce, innocuo, non invasivo ed efficace.

Possiamo anche confrontarlo con il metodo convenzionale, basato su microiniezioni, il quale rende possibile il trattamento di diversi embrioni allo stesso tempo e migliora l'effetto di protezione offerto dalle proteine antifreeze ai diversi compartimenti cellulari.

5.4.2 Applicazione AFP al Liquido Seminale

Sono stati presentati vari reports riguardanti l'uso di AFP e AFGP per la conservazione del liquido seminale di montoni, topi, scimpanzé e tori.

Nel 1994, Payane ha valutato l'addizione di AFP e AFGP del primo tipo a concentrazioni tra 0,1 e 10 µg/ml al mezzo congelato, che ha ridotto la perdita di motilità degli spermatozoi di montone.

Lo studioso ha notato che eseguire il raffreddamento prima dell'addizione di AFP porta a citotossicità e solo a concentrazioni di 10 µg/ml esse sono in grado di incrementare significativamente la percentuale di motilità degli spermatozoi dopo il congelamento/scongelamento, aumentando la resistenza osmotica e riducendo lo stress meccanico alla membrana cellulare.

In un altro report è stato suggerito che l'addizione di AFP del terzo tipo dei pesci, incrementa la vitalità cellulare, la velocità e la linearità del movimento del seme di un pesce teleosteo, lo *Sparus aurata*, sempre durante l'esecuzione del processo di congelamento scongelamento.

5.4.3 Piastrine

E' confermato che le piastrine del sangue perdano la loro attività in condizioni di ipotermia.

Attualmente le piastrine sono conservate a 22°C, che però limita la shelf-life a 5 gg.

L'incubazione delle piastrine con AFGP previene la formazione di granuli di ghiaccio in maniera dipendente dalla concentrazione.

In tale situazione le piastrine possono essere conservate a 4°C senza perdere la loro attività e la loro shelf-life può essere allungata fino a 21 giorni.

5.4.4 Globuli rossi

Riferendosi sempre al circolo sanguigno, prima gli scienziati Knight e Duman e poi lo studioso Tablin nel decennio 1986-1996, hanno caratterizzato l'influenza delle AFP sulla crioconservazione di globuli rossi.

E' stato osservato che basse concentrazioni di AFP dalla soglia invernale sono capaci di condurre ad aumento del tasso di sopravvivenza dei globuli rossi crio-preserved in soluzione di amido e idrossietile anche dopo il riscaldamento, inibendo la ricristallizzazione del ghiaccio nelle regioni extracellulari.

5.5 CRIOCHIRURGIA

La criochirurgia è una tecnica poco invasiva che consente il congelamento di tessuti indesiderabili, seguito dalla loro rimozione per proteggere il tessuto sano.

Nel 1999 Pharm ha osservato che iniettando l'AFP di primo tipo ad una concentrazione di 10 mg/ml in 1 ml di soluzione PBS nell'adenocarcinoma subcutaneo metastatico alla prostata di topi, veniva incrementata la distruzione di strutture cellulari, connettive e delle membrane nucleari malate dopo riscaldamento per la formazione di cristalli che esibivano morfologie ad ago, portando invece alla sopravvivenza dei tessuti sani.

Tale studio suggerisce che l'uso addizionale di AFP nella criochirurgia può ridurre i problemi che possono verificarsi a causa della sopravvivenza al congelamento di tessuti indesiderati.

CONCLUSIONI

In natura, la formazione di ghiaccio può avere conseguenze dannose per gli esseri viventi che colonizzano le regioni fredde della terra.

Questi organismi però sono stati coinvolti in un processo di adattamento che li ha portati ad acquisire una notevole resistenza alle basse temperature.

Alcuni studiosi hanno cominciato a guardare con interesse alle diverse possibilità di adattamento degli organismi.

Tramite un'approfondita ricerca hanno scoperto una serie di strutture proteiche e glicoproteiche con la capacità di legarsi ai cristalli di ghiaccio e bloccare il loro sviluppo.

I metodi di rilevazione applicati a tali macromolecole hanno contribuito ad aumentare le conoscenze riguardo il loro meccanismo d'azione.

Diversi settori possono trarre beneficio dallo sfruttamento delle proprietà di queste proteine e glicoproteine antigelo, ma in questo elaborato è stato fatto particolare riferimento al campo delle tecnologie alimentari, dove si sta svolgendo tutt'ora la ricerca di soluzioni non nocive che permettano di rendere ancora più efficaci i processi di conservazione degli alimenti, in particolare quelli basati sulle basse temperature come la surgelazione.

La surgelazione infatti è una tecnica in cui sarebbe auspicabile riuscire tenere sotto controllo lo sviluppo del ghiaccio e un ruolo chiave in questo senso potrebbe essere ricoperto dalle AFP e dalle AFGP.

Tuttavia, l'estrazione di tali proteine rimane una procedura molto onerosa, perciò i ricercatori sono indirizzati a elaborare degli equivalenti modelli sintetici che rispecchino le caratteristiche strutturali e di funzionamento originali delle macromolecole che sono state descritte nell'elaborato, permettendo di aumentarne la disponibilità a livello commerciale e di conseguenza l'applicabilità in un contesto quotidiano.

BIBLIOGRAFIA

- Yeh Y, Feeney RE: Antifreeze proteins structure and mechanism of function *Chem Rev* 1996 96:601-617
- Sun X, Griffith M, Pasternak JJ, Glick BR: Low temperature growth freezing survival and production of antifreeze proteins by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 *Can J Microbiol* 1995 41: 776-784
- Scott GK, Fletcher GL, Davies PL: Fish antifreeze proteins: recent gene evolution *Can J Fish Aquatic Sci* 1986 43:1028-1034
- Davies PL, Ewart KV, Fletcher GL: the diversity and distribution of fish antifreeze proteins new insight into their origins In *fish biochemistry and molecular biology vol.2* Edited by Mommsen TP, Hochachka PW, Amsterdam Elsevier 1993 279-291
- Chen L, De Vries AL, Cheng CHC: Evolution of antifreeze glycoproteins from a trypsinogen gene of an antarctic notothenioid fish. *Proc Natl Acad Sci Usa* 1997 94:3811-3816
- Logsdon JM, Doolittle WF: Origin of antifreeze proteins genes: a cold tail in molecular evolution *Proc Natl Acad Sci Usa* 1997 94:3485-3487
- Worrall D, Elias E, Ashford D, Smallwood M, Sidebottom C, Lillford P, Telford J, Holt C, A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science* 1998 282 115–117
- Zhang DQ, Wang HB, Liu B, Feng DR, He YM and Wang JF Carrot antifreeze protein does not exhibit the polygalacturonase-inhibiting activity of PGIP family. *Acta Genetica Sin.* 2006 33 1027–1036
- Tremblay K, Ouellet F, Fournier J, Danyluk J and Sarhan F Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals. *Plant Cell Physiol.* 2005 46 884-891
- Vandenhede, J. R.; Ahmed, A. I.; Feeney, R. E. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 7885
- Feeney, R. E. *Am. Sci.* 1974, 12, 712
- DeVries, A. L.; Komatsu, S. K.; Feeney, R. E. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 2901
- Tomimatsu, Y.; Scherer, J. R.; Yeh, Y.; Feeney, R. E. *J. Biol. Chem.* 1976, 251, 2290

- Bush, C. A.; Feeney, R. E.; Osuga, D. T.; Ralapati, S.; Yeh., Y. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1981, 17, 125
- Bush, C. A.; Ralapati, S.; Matson, G. M.; Yamasaki, R. B.; Osuga, D. T.; Yeh, Y.; Feeney, R. E. *Arch. Biochem. Biophys.* 1984, 232, 624
- Bush, C. A.; Feeney, R. E. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1986, 28, 386
- Mimura, Y.; Yamamoto, Y.; Inoue, Y.; Chujo, R. *Int. J. Biol. Macromol.* 1992, 14, 242
- Filira, R.; Biondi, L.; Scolaro, B.; Foffani, M. T.; Mammi, S.; Peggion, E.; Rocchi, R. *Int. J. Biol. Macromol.* 1990, 12, 41.
- Drewes, J. A.; Rowlen, K. L. *Biophys. J.* 1993, 65, 985
- Ahmed, A. I.; Feeney, R. E.; Osuga, D. T.; Yeh, Y. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 3344
- Duman, J. G.; DeVries, A. L. *Nature (London)* 1974, 247, 237
- Hew, C. L.; Yip, C. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 71, 845.
- Wen, D.; Laursen, R. A. *J. Biol Chem.* 1992, 267, 14102
- Ananthanarayanan, V. S.; Hew, C. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977, 74, 685
- Raymond, J. A.; Radding, W.; DeVries, A. L. *Biopolymers* 1977, 16, 2575
- Yang, D. S. C.; Sax, M.; Chakrabartty, A.; Hew, C. L. *Nature (London)* 1988, 333, 232
- Sicheri, F. V.; Yang, D. S. C. *Nature (London)* 1995, 375, 427
- Patterson, J. L.; Duman, J. G. *J. Exp. Zool.* 1982, 219, 381
- Hew, C. L.; Kao, M. H.; So, Y. S.; Lim, K. P. *Can. J. Zool.* 1983, 61, 2324
- Ewart, K. V.; Fletcher, G. L. *Can. J. Zool.* 1990, 68, 1652
- Sonnichsen, F. D.; Sykes, B. D.; Davies, P. L. *Protein Sci.* 1995, 4, 460
- Ng, N. F.; Hew, C. L. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 16069
- Hew, C. L.; Slaughter, D.; Joshi, S. B.; Fletcher, G. L.; Ananthanarayanan, V. S. *J. Comp. Physiol.* 1984, 155B, 81
- Deng G, Andrews DW, Laursen RA: Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein from longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*, *FEBBS Lett* 1997 402:17-20
- Graham LA, Liou L-C, Walker VK, Davies PL: Hyperactive antifreeze proteins from beetles *Nature* 1997 388:727-728

- Tysencho MG, Doucet D, Davies PL, Walker VK : The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein Nat. Biotechnol, 1997 15:887-890
- Duman JG Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara*. Biochim. Biophys. Acta 1994 1206 129–135
- Fei YB, Cao PX, Gao SQ, Wang B, Wei LB, Zhao J, Chen G and Wang BH Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus*. Prep. Biochem. Biotechnol. 2008 38 179–190
- Gupta R and Deswal R Low temperature stress modulated secretome analysis and purification of antifreeze protein from *Hippophae rhamnoides*, a Himalayan wonder plant. J. Proteome Res. 2012 11 2684–2696
- Pudney PDA, Buckley SL, Sidebottom CM, Twigg SN, Sevilla MP, Holt CB, Roper D, Telford JH. The physicochemical characterisation of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) Arch. Biochem. Biophys. 2003 410 238–245
- Smallwood M, Warrall D, Byass L, Elias L, Ashford D, Doucet CJ, Holt C, Telford J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*). Biochem. J. 1999 340 385–391
- Kuiper MJ, Davies PL and Walker VK. A theoretical model of a plant antifreeze protein from *Lolium perenne*. Biophysical J. 2001 81 3560–3565
- Middleton AJ, Brown AM, Davies PL and Walker VK. Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein. FEBS Lett. 2009 583 815–819
- Zhang DQ, Liu B, Feng DR, He YM and Wang JF Expression purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants. Protein Expr. Purif. 2004 35 257–63
- Middleton AJ, Marshall CB, Faucher F, Bar-Dolev M, Braslavsky, Campbell RL, Walker VK and Davies PL. Antifreeze protein from freeze-tolerant grass has a beta-roll fold with an irregularly structured ice-binding site. J. Mol. Biol. 2012 416 713–724
- Hon WC, Griffith M, Mlynarz A, Kwok YC and Yang DSC. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis related proteins. Plant Physiol. 1995 109 879–889

- Jarzabek M, Pukacki PM and Nuc K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* spp.). *Cryobiology* 2009 58 268–274
- Franks, F.; Darlington, J.; Schenz, T.; Mathias, S. F.; Slade, L.; Levine, H. *Nature (London)* 1987, 325, 146
- Wilson, P. W.; Leader, J. P. *Biophys. J.* 1995, 68, 2098
- Hew C. L.; Yang, D. S. C. *Eur. J. Biochem.* 1992, 203, 33
- Raymond, J. A.; DeVries, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977, 74, 2589
- Knight, C. A.; DeVries, A. L.; Oolman, L. D. *Nature (London)* 1984, 308, 295
- Harrison, K.; Hallett, J.; Burcham, T. S.; Feeney, R. E.; Kerr, W. L.; Yeh, Y. *Nature (London)* 1987, 328, 241.
- Knight, C. A.; DeVries, A. L. *J. Cryst. Growth* 1994, 143, 301
- Vesenska, J. P.; Feeney, R. E.; Yeh, Y. *J. Cryst. Growth* 1993, 130, 67
- Knight, C.A., Hallett, J., and DeVries, A.L. Solute effects on ice recrystallization: a n ass essment technique, *Cryobiology* 1988 25, 55-60
- Smallwood, M., Warrall, D., Byass, L., Elias, L., Ashford, D., Doucet, C.J., Holt, C., Telford, J., Lillford, P., and Bowles, D.J. Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) *Biochem J* 1999 340, 385-391
- Tomczak, M.M., Marshall, C.B., Gilbert, J.A., and Davies P.L. A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 311, 1041-1046
- Grabar, K.C., Freeman, R.G., Hommer, M.B., and Natan, M.J. Preparation and Characterization of Au colloid Monolayers. *Anal Chem* 1995 67, 735-743
- Griffith, M., and Ewart, K.V. Antifreeze proteins and their potential uses in frozen foods. *Biotechnol Adv* 1995 13, 375-402
- Feeney, R.F., and Yeh, Y. Antifreeze proteins: current status and possible food uses. *Trends Food Sci Technol* 1989, 1-5
- Wathen, B. and Jia, Z. Controlling the freezing process with antifreeze proteins. In *Emerging technologies for food processing*, (ed s. D. Sun), Elsevier, London, pp 2005653-674
- Warren, C. J., Mueller, C. M., & Mckown, R. L., (1992). Ice crystal growth suppression polypeptides and methods of preparation. US Patent 1992 5,118,792

- Payne, S. R., Sandford, D., Harris, A., & Young, O. A. (1994). The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. *Meat Science*, 37, 429–438
- Kozloff, L. M., Schofield, M. A., & Lute, M. Ice-nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*, 1983 153, 222–234
- Li, J., & Lee, T. C. Bacterial extracellular ice nucleator effects on freezing of foods. *Journal of Food Science*, 1998 63, 375–381
- Kontogiorgos, V., Regand, A., Yada, R. Y., and Goff, H. D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. *J Food Biochem* 2007 31,139-160
- Xu, H.N., Huang, W.N., Jia, C.L., Kim, Y.S. and Liu, H.P. Evaluation of water holding capacity and breadmaking properties for frozen dough containing ice structuring proteins from winter wheat. *J Cereal Sci* 2009 49, 250-253
- Worrall, D., Elias, L., Ashford, D., Smallwood, M., Sidebottom, C., Lilliford, P., Telford, J., Holt, C. and Bowles, D. A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallisation. *Science* 1998 282, 115-117
- Fletcher, G. L., Hew, C. L., and Davis, P. L. Antifreeze proteins of teleost fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 2001 63, 359-390
- Rubinsky, B., Arav, A., and Fletcher, G.L. Hypothermic protection- a fundamental property of antifreeze proteins. *Biochem Biophys Res Comm* 1991 180,566-571
- Payne, S. R., Sandford, D., Harris, A., and Young, O. A
The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meats. *Meat Sci* 1994 37, 429-438
- Knight, C.A., and Duman, J.G. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role. *Cryobiology* 1986 23, 256-262
- Tablin, F., Oliver, A.E., Walker, N.J., Crowe, L.M. and Crowe, J.H.
Membrane phase transition of intact human platelets: correlation with cold-induced activation. *J Cell Physiol* 1996 168 305-313
- Pham, L., Dahiya, R. and Rubinsky, B. An in vivo study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery. *Cryobiology* 1999 38, 169-175

