

Antifriz Proteinler

Gizem Işıl BEKTAŞ¹, Arif ALTINTAŞ²

¹ T.K.B. Merkez Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü, Etlik, Ankara-Türkiye; ² Prof. Dr. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya AD, 06110-Ankara-Türkiye

Özet: İlk kez Antartik sularında yaşayan Notothenioid'lerde varlığı gösterilen Antifriz proteinler (AFGP ve AFP) her biri üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalan bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetilgalaktozamin)n tekrarlanması ile meydana gelen bir glikopeptid yapıdadır. Bu glikopeptidler balığın derisinden vücuda giren ufak buz kristallerine hidroksil grupları (-OH), diğer polar grupları ve amino asit zincirlerindeki karbonil (=C=O) grupları ile tutunup, kristallerin büyümesini önleyerek canlıyı donmaya karşı korumaktadır. Antifriz proteinlerin tripsinojen genin birtakım çoğalmaları sonucunda oluştuğu ve karaciğer ve deri kaynaklı olabileceği, antifriz protein ailesinin bitki ve böcek tipine ek olarak 5 tip proteini kapsadığı saptanmıştır. Günümüzde bu proteinler tıp, gıda ve endüstri alanlarında etkin biçimde kullanılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Antifriz protein, Balık antifriz proteinleri, Buz şekillendirici proteinler.

Antifreeze Proteins

Summary: Antifreeze proteins first found in the Notothenioid in Antarctic ocean. The protein consist of a repeated glycopeptide, Ala-Ala-Thr-galactosyl-N-acetyl galactosamine. These glycopeptides made bond with hydroxyl (-OH) and carbonyl (=C=O) groups to the ice crystal to prevent freezing. While ice crystal was entering the skin antifreeze proteins bind to ice crystal, by this way crystal growth can be stopped. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene and origin from skin or liver. Antifreeze proteins family has 5 type of protein, plant and insect form. Nowadays antifreeze proteins are common used in foods, medical and industrial area.

Key words: Antifreeze Protein, Fish Antifreeze Proteins, Ice Structuring Proteins.

Giriş

Dünya üzerindeki pek çok organizma topluluğu, değişen ekolojik koşullara başarıyla adapte olmalarını sağlayan değişimler göstermiştir. Bu değişimler, yaşanan ortamın fiziksel ve kimyasal koşullarına bağlı olduğu gibi göç, üreme davranışları ve beslenme alışkanlıkları gibi farklı biyolojik faktörlerin etkisinde kalır. Kazanılan bu adaptasyonlardan güncel gelişime en iyi örnek buzullarda yaşayan balıklardır. Antartik Okyanusu soğuyup buzullarla kaplandığında balık türlerinin çoğu yok olmuştur. Buna karşın, bir alt takıma (Notothenioidei) ait balıklar güçlüklerin üstesinden gelebilmişlerdir. Buzullarda yaşamaya adapte olmuş bu balıkların soğuk okyanuslarda başarıyla yaşamlarını sürdürebilmelerinin sebebi glikoprotein yapıda antifriz moleküller (AFGP) salgılamalarıdır.

Antartika sularındaki buz, balıklar için ciddi tehlikedir. Çünkü balığın solungaçlarından ve derisinden kolayca sızabilmektedir. Soğukkanlı hayvanlar olan ve temelde çevreleriyle aynı ısıya sahip

olan balıklar, kanları dengedeki donma noktasının 1°C altına kadar soğuduğunda bile yaşamlarını sürdürebilirler; bu buz kristallerinin oluştuğu ısıdır. Ancak balıkların aşırı soğumaya dayanabilmeleri ve vücut sıvılarının akıcılığını korumaları bedenlerine buz girmedeği sürece mümkün olmaktadır. Isısı dengedeki donma noktasının 0,1°C altına düşmüş balığın çevresindeki buz, balığın derisinden içeri hızla sızarak vücut sıvılarını dondurur. Çoğu tropik ve ılıman iklim balıkları, çevrelerindeki suda buz olduğu takdirde vücut ısısı -0,8°C civarına düşüğünde donarlar. Fakat Antartika Notothenioidlerinin donması için ısının -2,2°C'ye düşmesi gerekir (Eastman ve DeVries, 1986).

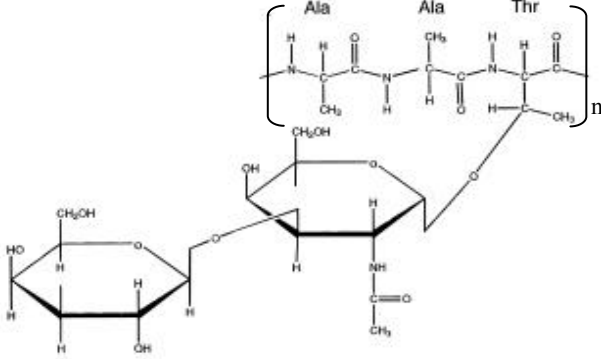
Antartik balıkların düşen donma noktasını dengelemeleri ve hayatta kalabilmeleri, vücut sıvılarında bulunan sekiz antifriz molekülü ile mümkün olmuştur. Bu moleküller takımı idrar ve göz sıvıları dışındaki vücut sıvılarında ve hücre stoplazmasında bulunur (Eastman ve DeVries, 1986).

Antifriz glikoprotein (AFGP) ilk kez Antartika'da yaşayan bir balık türü olan *Notothenioid*'lerde bulunmuştur (Crevel ve ark, 2002). Antifriz moleküllerinin varlığı daha sonra *Nototheniidae*, *Artedidraconidae*, *Batydracanyidae*, *Channichthyidae*, *Muraenolepididae*, *Liparididae*, *Zoarcidae* ve *Myctophyidae* ailelerine ait toplam 37 türde tespit edilmiştir (Sidell, 2000).

Antifriz proteinler günümüzde tıp, gıda ve endüstri alanlarında kullanılmaya başlanmış ve önemli bir hale gelmiştir. Bu nedenle derlemede, antifriz proteinlerin bazı özellikleri ile ilgili bilgi verilmesi ve tanıtılması amaçlanmıştır.

Antifriz proteinlerin yapısı ve görevleri

Antifriz molekülleri glikopeptid yapıdadır (alanin-alanin-threonin-galaktozil-N-asetil galaktozamin)n. Her biri üç amino asitlik bir peptid zincirinin üçüncü amino asidine kovalan bağlarla bağlanmış bir disakkarit molekülünden oluşan birimlerin tekrarlanmasıyla meydana gelir (Crevel ve ark., 2002) (Şekil 1).



Şekil 1. Antifriz proteinlerde ortak monomer yapı

Glikopeptidler olarak bilinen bu antifriz molekülleri kendini tekrarlayan alt birimlerden oluşur ve molekül ağırlıklarına göre numaralandırılır: En ağır 33 700 daltonluk molekül olup No.1; en hafifi ise 2 600 daltonluk molekül olup No 8 olarak numaralanır. Bir'den beş'e kadar olan glikopeptidlerde tekrarlanan amino asit dizisi alanin-alanin-threonin'dir. Altı-sekiz no'lu glikopeptidlerde ise alaninlerin bazıları prolin ile yer değiştirmiştir (Crevel ve ark, 2002).

Bileşiklerin molekül ağırlıkları arttıkça, antifriz etkileri de artar ve görünürde sekiz molekül de işlevlerini benzer şekilde yürütür (Sidell, 2000).

Notothenioid antifrizlerinin sıvının donma noktasını nasıl düşürdüğünü anlayabilmek için, bunların

etkinlik biçimlerini vücut sıvılarında çözünmüş glikoz ve sodyum klorür gibi daha tipik maddelerin etkinlikleriyle karşılaştırmak gerekir. Çoğu çözeltilerin donma noktası, bu çözeltilerin bağlaşık özelliklerine, yani içindeki çözünmüş parçacıkların sayısına bağlıdır. Ne kadar çok parçacık varsa, su moleküllerinin kümeleşerek buz kristali oluşturma olasılığı o denli azdır. Sodyum klorür, su içerisinde sodyum ve klorür iyonlarına ayrıştığı için, sodyum klorürün suyun donma noktasını düşürücü etkisi, tek başına parçacık etkisinin yaratabileceğinden 200-300 kat daha fazladır (DeVries ve ark, 1970).

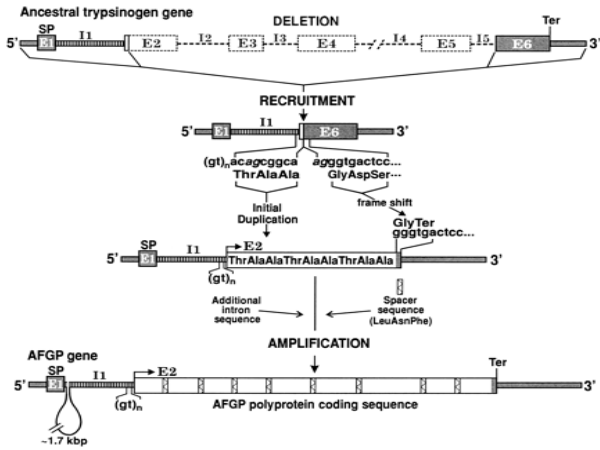
Glikopeptid antifrizlerin ufacık buz kristallerine tutunup, onların büyümelerini engellemek suretiyle Antartik balıklarının donmaya karşı koruduğu gösterilmiştir. Buzun yüzeyine tutunmuş glikopeptidler kristal büyümesini engeller. Bir buz kristali çevresindeki sıvının içindeki su moleküllerinin kristalin yatay düzlemine basamaklar halinde eklenmesiyle büyümektedir. Fakat, glikopeptid antifrizleriyle karşılaşan basamaklar eğilmektedir (Şekil 2). Bu durum, çevredeki sıvının sıcaklığı düşmediği sürece kristallerin büyümesini durdurur (Eastman ve DeVries, 1986).

Notothenioid'ler buz içermeyen su içine konulduklarında, ısıları -6°C 'ye düşene kadar donmamaktadır. Vücut içine dışarıdan buz sızmadığı sürece içeride buz kristalleri oluşmamaktadır. *Notothenioid*'lerin soğuğa karşı dayanabilme yeteneklerine yönelik asıl tehlike dışarıdaki buzdur ve antifriz proteinlerin asıl rolü de buzun deriden içeri sızmasını önlemektir. Pulları alınmış derinin iç yüzeyi antifriz molekülleri içeren tuz çözeltisine batırıldığında, deri dışardan buz girmesini önleyen bir engel olarak iş görmektedir; suya antifriz molekülleri eklenmemişse buz kristalleri deriden kolayca sızmaktadır (Eastman ve DeVries, 1986).

Antifriz moleküllerinin buza nasıl bağlandığı tam olarak bilinmemekle beraber antifrizlerin hidrosil grupları (-OH) ve diğer polar grupları amino asit zincirlerindeki karbonil (=CO-) grupları ile buza bağlandığı tahmin edilmektedir (Eastman ve DeVries, 1986).

Antifriz glikoproteinler (AFGP) ilk kez Antartik *Notothenioid*'lerde bulunmuştur. Bu antartik balıklarda farklı görevlere sahip iki gen bulunmaktadır. Birincisi pankreasta üretilen bir enzim olan tripsinojen için ikincisi ise balıkları donmaya

karşı koruyan antifriz glikoprotein içindir. Antifriz genin, triposinojen genden bir takım gen çoğalması (duplikasyonları) sonucunda oluştuğu kabul edilmektedir (Şekil 2). Bu gen çoğalması; çıkarma (deletion), ekleme (insertion), çoğalma (duplication), ve ardışık küçük parçalara uzama (amplification) ve geçiş mutasyonlarından oluşmaktadır (Chen L, 1997).



Şekil 2. Antifriz proteinlerin kökeni (Chen L, 1997).

Antifriz proteinler karaciğer ve deriden kaynaklanabilir. Antartik kış köpekdişi balığında (winter Table 1. Karaciğer ve deri formu AFP'lerinin özellikleri (Fletcher ve ark, 2001).

	Karaciğer	Deri
Doku ve hücre yerleşimi	Karaciğere özgü; prepro AFP olarak sentezlenir. ekstraselüler salgı proteini	Periferel dokulara dağılmıştır; İntraselüler AFP olarak sentezlenir.
Gen yapısı ve organizasyonu	40 kopya, ikili tekrarlar şeklinde; 2A-7b, gen yapısında İki ekzon ve bir intron içerir.	40 kopya, bağlı fakat düzensiz yerleşimli; F2, 11-3 yapısında İki ekzon bir intron içerir.
Mevsimsel/Hormonal regülasyon	GH tarafından inhibe edilir.	GH'dan etkilenmemektedir.
Transkripsiyon kontrolü	İntron karaciğere özgü geliştirilmiş C/EBP α * ve AEP** için DNA motifi içerir.	İntron her yerde bulunmaktadır, AEP ve diğer DNA bağlayıcı yapılar içerir. C/EBP α alanı TA eklemesinde yok olur.

* C/EBP α : CCAAT/enhancer-binding protein α (CCAAT bağlanmayı arttırıcı protein)

** AEP: Antifreeze Enhancer-binding Protein (Antifriz bağlanmayı arttırıcı protein)

Antifriz proteinlerin tümünün donmayı değil de buz kristallerinin oluşumunu engellediğinin anlaşılması üzerine görevlerinin daha doğru ifade edilmesi gereği hissedilmiş ve antifriz proteinler ile otomotiv sektöründe kullanılan antifriz (etilen glikol) arasındaki farkın daha iyi anlaşılmasının sağlanması için adının "Buz Şekillendirici Protein" (ISP, Ice Structuring Protein) olarak yeniden adlandırılmasının daha doğru olacağı önerilmektedir (Clarke ve ark, 2002).

flounder) yapılan bir çalışmada (Fletcher ve ark, 2001), deri cDNA'sını inceleme sırasında iki tip antifriz proteinin var olduğu görülmüştür (deri formu=wfsAFP ve karaciğer formu=wflAFP). Karaciğer AFP cDNA klonlamasında, karaciğer mRNA'sında preprotein olarak kodlanır. Balıklarda; Ekim ayında karaciğerde AFP mRNA'nın artış göstermeye başladığı, yaklaşık bir ay içerisinde de plazma AFP değerinde artış görüldüğü ve bu miktarın Mart, Nisan aylarında düşmeye başladığı gösterilmiştir (Fletcher ve ark, 2001). Kış aylarında karaciğerdeki AFP mRNA ve plazma AFP değerleri pik yapmaktadır. Antartik kemikli balıklarda, büyüme hormonunun (GH) hipofiz bezinden salınımı ve insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1) sentezi karaciğer tarafından yapılmaktadır. Büyüme hormonu AFP genin transkripsiyonunu baskı altında tutarak, bütün sene boyunca plazma AFP seviyesini düzenlemektedir (Tablo 1).

Deri formu AFP'nin karaciğer formu AFP'den farkı pre- ve pro- yapıların eksik olmasıdır. Deri AFP'nin pre yapısının eksikliği proteinin intraselüler olarak çalıştığını göstermektedir (Tablo 1) (Fletcher ve ark, 2001).

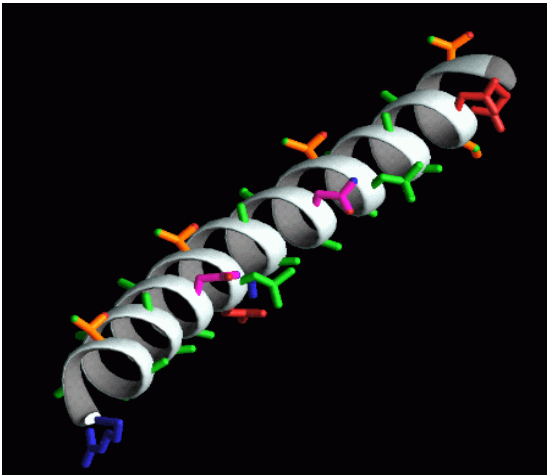
Antifriz protein türleri

Antifriz proteinleri birçok organizmayı donma etkisine karşı korumaktadır. Bu proteinler balıklarda olduğu gibi bazı bakteri, bitki ve böcek türlerinde de bulunmaktadır. Günümüzde beş tip balık antifriz proteini bilinmektedir (Tablo 2). Antifriz glikoprotein (AFGP) ve Tip 1 AFP, Tip 2 AFP, Tip 3 AFP, Tip 4 AFP. Bu proteinlerin yapısal değişikliklerine rağmen, görevleri ve buz kristaline bağlanma özellikleri benzerdir (Fletcher ve ark, 1999).

Tablo 2. Antifriz Proteinlerin başlıca özellikleri ve doğal kaynakları (Fletcher ve ark, 1999).

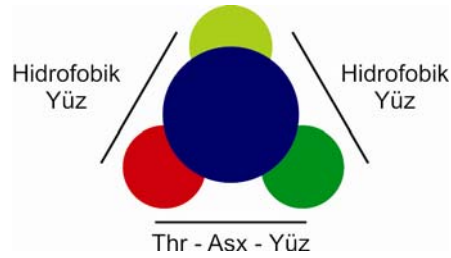
Özellik	AFGP	AFP		
		Tip I	Tip II	Tip III
Molekül ağırlığı, Da	2,600-33,000	3,300-4,500	11,000-24,000	6,500
Birincil Yapı	(alanin-alanin-threonin) _n disakkarit	Alanin zengin toplam 11 amino asit tekrarı	Sistin zengin, disulfid bağlı	Genel
Karbonhidrat	Var	Yok	Yok (Çamuka'da <3% karbonhidrat)	Yok
İkincil yapı	Genişletilmiş	α -Sarmal amfifilik	β -Tabaka	β -Sandwich
Üçüncül yapı	Tanımlanmamış	%100 sarmal	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
Biyosentez	Multiprotein	Prepro AFP	Prepro AFP (deniz aslanı)	Pro AFP
Protein içeriği	8	7	2 – 6	12
Gen Kopyası	Tanımlanmamış	80-100	15	30-150
Doğal kaynaklar	Antartik Notothenioidler, Kuzey kıyıları	Sağ Gözlü Derepisi (Kış Köpekdi), Kısaboynuzlu Sculpin	Deniz Aslanı, Çamuka, Ringa Balığı	Okyanus Somurtkan Balığı

Tip 1 Antifriz protein: Tip 1 AFP'leri, kış köpekdi (kemikli balıklar takımının yan yüzergiller ailesinden) ve kısaboynuzlu Sculpin'lerde bulunmaktadır. İlk kez bu balıklarda AFP'nin üç boyutlu yapısı açıklanmıştır (Duman ve DeVries, 1976).

Şekil 3. Tip 1 AFP'in α -Sarmal yapısı (Duman ve DeVries, 1976)

Tip 1 AFP'in birincil yapısı kararlı sarmal yapıdadır. Alanin'ce zengin birbirini tekrarlayan toplam 11 aminoasitten oluşmuştur. İkincil yapı, basit, uzun, amfipatik alfa sarmaldır (Şekil 3). Yaklaşık 3.3-4.5 kDa molekül ağırlığındadır. Üçüncül yapının tamamı sarmaldır. Tip 1 AFP'nin üç boyutlu yapısında üç adet yüz (hidrofobik, hidrofilik ve Thr-

Asx) bulunmaktadır (Şekil 4) (Duman ve DeVries, 1976)



Şekil 4. Tip 1 AFP'nin çevresiyle ilişkiye girebilecek yüzleri (Duman ve DeVries, 1976)

Tip 1 hiperaktif AFP bazı Sağgözlü Derepisi'nde (kemikli balık yan yüzergiller ailesi) bulunmaktadır. Yaklaşık 32 kDa ağırlığındadır (17kDa'luk iki monomer, bir dimerik molekül). Bu AFP donma ısısı düşük sulara bulunan balıklarda oldukça çok bulunmaktadır (Scotter, 2006). Tip 1 Antifriz proteinin buza tutunmasında hidrojen bağlarının büyük rol oynadığı, buza bağlanmada ısıyla ilgili en büyük yardımı da protein ile buz arasındaki Van der Waals etkisinin oluşturduğu düşünülmektedir (Sicheri ve Yang, 1995).

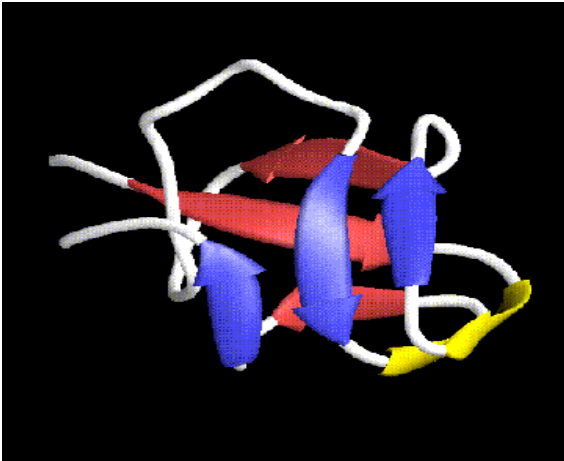
Tip 2 Antifriz protein: Deniz Aslanı'nda, Çamuka'da ve Ringa Balığı'nda bulunmakta olup yapısı tam olarak bilinmemektedir. Sistin'ce zengin bir globuler protein olup beş disulfid bağı içermektedir (Ng ve Hew, 1992). Molekül ağırlığı 11,000-

24,000 Da olup ikincil yapısı Tabaka yapıdan zengindir (Şekil 5), üçüncül yapısı ise henüz bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).



Şekil 5. Tip 2 AFP'nin ikincil yapısı (Anonim,1999)

Tip 3 Antifriz protein: Antartik Yılan Balığı'nda bulunan Tip 3 AFP'in molekül ağırlığı yaklaşık 6 kDa'dur. Buza bağlanma yüzeyinde gösterdiği hidrofob özelliği Tip 1 AFP ile aynıdır (Crevel ve ark, 2002). Tip 3 AFP'in birincil yapısı genel antifriz proteini yapısındadır. Tip 1 AFP'e benzer özelliktedir. İkincil yapısı -Sandwich modelde olup (Şekil 6), üçüncül yapısı bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).



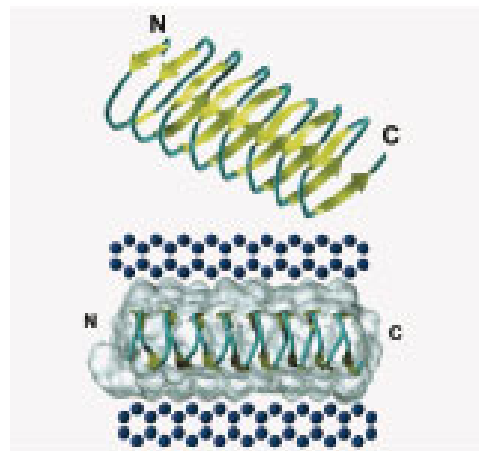
Şekil 6. Tip 3 AFP'in β -Sandwich modeli (Anonim,1999)

Tip 4 Antifriz protein: Tip 4 AFP Uzun Boynuzlu Sculpin plazmasında tespit edilmiş, alfa sarmal yapıda ve glutamat ve glutaminden zengin bir glikoproteindir (Deng ve ark, 1997). Diğer yapıları tam olarak bilinmemektedir (Fletcher ve ark, 1999).

Böcek antifriz proteini: Hiperaktif (yüksek termal histerez değerlerde) Antifriz protein olarak böceklerde bulunmuş bu protein Tip 5 Antifriz Protein olarak da adlandırılabilir (Graham, 1997).

Tenebrio ve Dendroides Antifriz Proteinleri diğer böcek ailelerinde bulunmaktadır ve yapıları birbirlerine oldukça benzemektedir. Bu Antifriz proteinlerin molekül ağırlıkları yaklaşık 8.3-12.5 kDa olup aminoasit dizisi boyunca, en az her altıda bir sistin rezidüsü yer alır (Duman, 2001). Kar Piresi'ndeki (*Hypogastrura harveyi*) AFP'lerin buza bağlanmasının diğer AFP'lere göre daha farklı olduğu keşfedilmiştir (Graham ve Davies, 2005). Bütün AFP'ler donma sırasında buza bağlanarak buz kristalinin büyümesini engellemektedir. Bu olay; kın kanatlı böceklerde ve güvede, buza threonin bölgesinden, kar piresinde ise glisin bölgesinden bağlanmak suretiyle gerçekleşmektedir. Glisin, protein yapısındaki esneklik ile ilişkilidir. Kın kanatlılarda (*Denroides canadensis*, DcAFP) tekrar eden disülfid bağlı 12-rezidü (TCTxSxxCxxAx) halkada Thr-Cys-Thr içeren bir buza bağlanma demeti içerir (Graham ve Davies, 2005).

Bitki antifriz proteini: AFP'lerin sınıflandırılması Bitki AFP'in keşfi ile daha karmaşık hale gelmiştir (Griffith, 1992). Bitki AFP'leri diğer AFP'lerden bazı yönlerden farklılık göstermektedir. Bunlar; diğer AFP'lere göre daha zayıf termal histerez (doğa olaylarının gelişmesindeki gecikme) aktiviteye sahiptir. Diğer AFP'lerin fizyolojik görevi buz oluşumunu önlemek iken Bitki AFP'leri tekrar kristal oluşumunu engellemektedir. Bitki AFP'lerinin çoğu patogenezi ilişkili proteinlerdir. Bazen antifungal aktiviteye de sahip olabilir (Griffith ve Yaish, 2004). Bitki AFP'in üç boyutlu yapısı, 118-rezidülü -sarmal yapıda 8 halkadan oluşan 14-15 aminoasitten ibarettir (Kuiper ve ark, 2001).



Şekil 7. Bitki Antifriz Proteinin β -Sarmal yapısı ve buz kristaline bağlanması (Kuiper ve ark, 2001)

Yaşlı karaçayır bitkisinin protein yapısının önemli bölümünü AFP oluşturmaktadır. Şekil 7’de Bitki AFP’in -sarmal yapısı teorik olarak gösterilmektedir. Birbirine paralel iki -tabaka bölgesinde sarı renkle gösterilen buza bağlanma alanları bulunmaktadır. Bu protein, aynı hizaya geldiği varsayılan iki prizma yüzeyi arasında (mavi bölge) buzun içeri girmesini önleyen, ara yüzey zıncığı gibi görev alır ve tekrar kristalleşmeyi önler (Kuiper ve ark, 2001).

Sonuç ve Öneriler

Antifriz proteinler (alanin-alanin-threonin)-galaktozil-N-asetil galaktozamin monomerlerinden oluşan polimerler olup buz kristaline bağlanarak kristalin büyümesini engellemek suretiyle canlıları donmaya karşı korurlar. Karaciğer ve deri kaynaklı olan AFP’ler Tıp, Gıda ve Endüstri alanlarında etkin biçimde kullanılmaktadırlar. Dokuların dondurularak korunmasında, kışın sert geçtiği bölgelerdeki ekinlerin donma noktasının düşürülmesinde, sıcak su balıklarının daha serin sularda üretilmesini ve adaptasyonunu sağlamada, dondurulmuş gıdaların raf ömrünü uzatmada, dondurma cerrahisinin (Kriyocerrahi’nin) gelişmesinde, tıpta transplantı veya transfüzyonu yapılacak dokuların daha iyi saklanmasında ve hipotermi tedavisinde olmak üzere farklı alanlarda yararlanılmaktadır. AFP’in buz kristallerinin oluşumunu engellemesi üzerine adının “Buz Şekillendirici Protein” olarak yeniden adlandırılması önerilmektedir.

Kaynaklar

1. **Crevel R.W.R., Fedyk J.K., Spurgeon M.J.** (2002). Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure (Review). *Food and Chemical Toxicology* 20, 899-903.
2. **Eastman J.T., Devries A.L.** (1986), Olağan Dışı Yaşamlar TÜBİTAK, Mart 1999 .
3. **Sidell B.D.** (2000) School of Marine Sciences, University of Maine, Orono ME Gravitational and Space Biology Bulletin 13(2).
4. **De Vries A.L., Komatsu S.K., Feeney R.E.** (1970). Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *J Biol Chem.* 245:11, 2901-8.
5. **Chen L, De Vries A.L.** (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 94, pp. 3811-3816, April 1997, Evolution.
6. **Fletcher G.L., Hew C.L., Davies P.L.** (2001). Antifreeze Proteins of Teleost Fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 359–90.
7. **Fletcher G.L., Goddard S.V, Wu Y.** (1999). Antifreeze proteins and their genes: From basic research to business opportunity. American Chemical Society, *Chemtech* 30(6),17-28.
8. **Duman J., Devries A.L.** (1976). Isolation, characterization and physical properties of protein antifreezes from the Winter Flounder *Pseudopleuronectes Americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* B54, 375–380.
9. **Scotter A.J.** (2006). The basis for hyperactivity of antifreeze proteins (Review). *Cryobiology* doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.06.06.
10. **Sicheri F., Yang D.S, Nature** 375:427-431, 1995.
11. **Ng N., Hew C.** (1992). Structure of antifreeze polypeptide from sea raven: Disulfide bonds and similarity to lectin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 267 (23): 16069-16075.
12. **Deng G., Andrews D.W., Laursen R.A.** (1997). Amino acid sequence of a new type of antifreeze protein, from the longhorn sculpin *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *FEBS Lett.* 402:1, 17-20.
13. **Graham L.** (1997). Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature* 388, 727-728.
14. **Duman J.G.** (2001). Antifreeze and Ice Nucleator Proteins in Terrestrial Arthropods. *Annu. Rev. Physiol.* 63, 327–57.
15. **Graham L., Davies P.** (2005) *Biophysical Journal* Vol:88 (953-958).
16. **Kuiper et al,** (2001). A Theoretical Model of a Plant Antifreeze Protein from *Lolium perenne*, *Biophysical Journal*, Vol: 81, Sayı 6.
17. **Griffith M., Yash M.** (2004). Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science* 9:8, 399-405.
18. **Griffith M.** (1992). Antifreeze Protein Produced Endogenously in Winter Rye Leaves. *Plant Physiology* 100:2, 593-596.
19. **Clarke C.J., Buckley S.L., Lindner N.** (2002) *Cryo Letters.* Mar-Apr; 23(2):89-92.