

Heterogene Eisnukleations- und Antigefriereigenschaften von Biomolekülen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

eingereicht von

Katharina Dreischmeier

Atmosphärische und Physikalische Chemie

Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

Dezember 2018

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. sind in Vorbereitung zur Veröffentlichung:

Dreischmeier, K., Budke, C., Wiehemeier, L., Kottke, T., and Koop, T.: Boreal pollen contain ice-nucleating as well as ice-binding 'antifreeze' polysaccharides, *Sci. Rep.*, 7, 41890–41908, 2017.

Eickhoff, L., Dreischmeier, K., Zipori, A., Sirotinskaya, V., Adar, C., Reicher, N., Braslavsky, I., Rudich, Y., and Koop, T.: Janus Behavior of Antifreeze Proteins: Ice Growth Inhibitors and Ice Nucleation Promoters, in Vorbereitung, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018.

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Koop

Zweitgutachter: PD Dr. Tilman Kottke

Zusammenfassung

Heterogene Eisnukleation spielt in der Atmosphäre eine wichtige Rolle bei der Bildung von Wolken und beeinflusst damit entscheidend sowohl die Albedo als auch den hydrologischen Zyklus der Erde. In dieser Arbeit wurde am Beispiel von Birkenpollenmakromolekülen mit einer Nukleationstemperatur von -18 °C und für *M. alpina* von -6 °C die Bedeutung biologischer Eisnukleatoren für diese atmosphärische Prozesse bestätigt. Aufgrund der hohen Konzentrationen der leicht mit Wasser von den Partikeln löslichen eisnukleierenden Makromoleküle, die für die Birkenpollen bei 10^4 Eiskeimen pro Polle bzw. 10^{12} g^{-1} und für die Pilzsporen aus *M. alpina* bei etwa 10^{11} g^{-1} Myzel liegen, sind diese Eisnukleatoren biologischen Ursprungs bei atmosphärischer Eisnukleation nicht zu vernachlässigen.

Es wurde die Eisaffinitätsaufreinigung (IAP) als Methode zur spezifischen Extraktion von eisbindenden Molekülen in der Arbeitsgruppe etabliert. Darüber konnte die Anwesenheit von eisstrukturierenden Molekülen im Birkenpollen-waschwasser sowie im Myzelextrakt von *M. alpina* gezeigt werden, die durch Adsorption an die sekundäre prismatische Fläche von hexagonalem Eis die dafür typische Sternchenform eines wachsenden Eiskristalls hervorrufen. Zudem konnte für die Birkenpollenmakromoleküle eine effektive Konzentration c_i zur Quantifizierung der Eisrekristallisationsinhibierung (IRI) von minimal 7 nmol l^{-1} erhalten werden, was einer hohen IRI-Aktivität entspricht. Für die *M. alpina*-Antigefrierermoleküle konnte eine IRI-Aktivität lediglich angedeutet werden.

Experimente mit Zentrifugenfiltern ergaben für beide Spezies, dass es sich bei den Eisnukleatoren und den Molekülen mit Antigefrieraktivität nicht um dasselbe Molekül handelt. Der Eisnukleator ist größer als 100 kDa , während das an Eis adsorbierende Molekül kleiner als 100 kDa sein muss, da es den Filter passiert. Diese Größenverhältnisse stimmen mit den üblichen Größen von Antigefrierproteinen mit einer Größe von etwa maximal 30 kDa und den deutlich größeren molekularen, biologischen Eisnukleatoren überein. Um die Nukleation bei relativ geringen Unterkühlungen ($T_{\text{nuk}} > -20\text{ °C}$) auszulösen, muss der Eiskeim eine bestimmte Mindestgröße von $\sim 50\text{ kDa}$ aufweisen. Die Antigefrierermoleküle dagegen agieren im Verbund mehrerer, an einen Eiskristall adsorbierender Moleküle und besitzen daher auch trotz der kleineren Größen einen Effekt auf das Wachstum von Kristallen.

Spektroskopische Experimente zur genaueren Charakterisierung der chemischen Natur der in den Birkenpollen enthaltenen eisnukleierenden und eisadsorbierenden Makromoleküle weisen auf carboxylierte Polysaccharide mit sehr ähnlicher Struktur hin. Möglicherweise bestehen die Eisnukleatoren aus Clustern der kleineren Antigefrierermoleküle. Im Fall von *M. alpina* ist eine Bestimmung der Struktur der Moleküle weniger eindeutig. Es gibt Hinweise auf unterschiedliche chemische

Identitäten der Eisnukleatoren, die demnach Proteine sein könnten, und der Antifrierermoleküle, die den Polysacchariden zugeordnet werden könnten.

In früheren detaillierten Studien wurde eine hohe Thermische Hystereseaktivität (TH) des hyperaktiven TmAFP aus dem gefriervermeidenden Organismus des *T. molitor* erhalten. Diese hohe TH-Aktivität konnte in dieser Arbeit mit Werten um 1 °C für eine 100 µM Lösung bestätigt werden. Zur TH-Bestimmung diente eine erstmals in dieser Arbeitsgruppe am Kryomikroskop erarbeitete Messmethode. Zudem wurde in erstmaligen IRI-Messungen eine hohe effektive Konzentration c_i von 1.6 µmol l⁻¹ bestimmt. Erste Nukleationsmessungen weisen auf eine duale Funktion dieses 8 kDa-Proteins mit einer mittleren Nukleationstemperatur von etwa -31 °C hin, die nach der klassischen Nukleationstheorie für einen kritischen Eiscluster derselben Größe tatsächlich erwartet würde.

Die Untersuchungen an den eisnukleierenden Pollen und dem Pilz *M. alpina* sowie dem Antifrierermolekül des *T. molitor* zeigen damit für Moleküle mit einer eisbindenden Stelle, dass deren Funktion im natürlichen Organismus als Eisnukleator oder Antifrierermolekül von der Molekülgröße bestimmt wird.

Abstract

Heterogeneous ice nucleation plays a very important role in the atmosphere by forming clouds influencing both the albedo and the hydrological cycle of the earth. Here, the significance of biological ice nucleators for atmospheric processes was confirmed on the examples of birch pollen and the fungus *M. alpina* that trigger the nucleation of ice at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ or $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. Due to the high concentration of the ice nucleating molecules that are easily released from its host by contact with water their impact on atmospheric ice nucleation is not negligible. The pollen release about 10^4 ice nucleating molecules per grain and accordingly 10^{12} per gram, the fungal spores up to 10^{11} per gram mycelium.

The ice affinity purification (IAP) method was established in this workgroup to specifically extract ice binding molecules. By means of the IAP the presence of ice structuring molecules in the birch pollen washing water as well as in the mycelium of *M. alpina* was shown. The ice crystals grew into a star-like shape induced by the molecules adsorbing at the secondary prism plane of hexagonal ice. The birch pollen macromolecules also inhibit the recrystallization of ice crystals (IRI) at a minimal effective concentration c_i of 7 nmol l^{-1} that is comparable to the activity of the very efficient IRI agents. An IRI activity of the *M. alpina* extract can merely be assumed.

Experiments using centrifugal filters with a molecular cutoff size of 100 kDa suggest that the ice nucleators and ice structuring molecules are not the same. The ice nucleating molecules are larger than 100 kDa while the antifreeze molecules pass the filter and must be smaller than 100 kDa. These sizes agree well with that of the known antifreeze proteins with sizes of maximum 30 kDa and that of the known biological ice nucleators with much larger sizes. To trigger ice nucleation at moderate supercoolings ($T_{\text{nuk}} > -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) an ice nucleus needs a minimal size of about 50 kDa. In contrast, several antifreeze molecules cooperate to inhibit the growth of an ice crystal so that their small size is sufficient for the antifreeze activity.

In order to characterize the chemical nature of the ice binding macromolecules infrared spectroscopy was applied. The ice nucleating and ice structuring macromolecules in birch pollen both seem to be carboxylated polysaccharides with very similar structures. It is possible that the larger ice nucleators consist of clusters of the smaller antifreezes. The structural identification of *M. alpina* macromolecules could not be entirely resolved. However, the spectra indicate a proteinaceous identity of the ice nucleators and polysaccharides as ice structuring molecules.

In previous studies the high thermal hysteresis (TH) activity of the hyperactive antifreeze protein from the freeze avoiding organism of *T. molitor* was shown. Here this high TH activity was confirmed in experiments with a cryomicroscope, which was newly set up for TH measurements. The *T. molitor* antifreeze proteins showed freezing depressions of about $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a $100\text{ }\mu\text{M}$ solution. Further, an IRI activity with an

effective concentration c_i of $1.6 \mu\text{mol l}^{-1}$ was obtained. For the first time ice nucleation measurements show a dual function of this 8 kDa protein. The measured heterogeneous ice nucleation temperature of about $-31 \text{ }^\circ\text{C}$ is actually expected from Classical Nucleation Theory for a critical ice embryo of this size.

In summary, these results show that the predominant function of an ice binding molecule in an organism as an ice nucleating or antifreeze molecule is determined by its size.

Inhaltsverzeichnis	
1. Einleitung und Motivation	1
2. Theoretischer Hintergrund und experimentelle Methoden	3
2.1. Der Nukleationsprozess von Eis	3
2.1.1. Die Klassische Nukleationstheorie.....	4
2.1.2. Heterogene Nukleation	9
2.1.3. Heterogene Eisnukleatoren in natürlichen Systemen	17
2.1.4. Eisnukleation in wässrigen Lösungen: Wasseraktivitätsbasierte Eisnukleationstheorie.....	32
2.2. Experimentelle Methoden zur Untersuchung der heterogenen Eisnukleation	37
2.2.1. BINARY (Bielefeld Ice Nucleation ARraY)	37
2.2.2. Dynamische Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)	45
2.2.3. Mikrofluidik.....	53
2.3. Antigefriereigenschaften von Molekülen	57
2.3.1. Eisstrukturierung	59
2.3.2. Thermische Hysterese	60
2.3.3. Eisrekristallisation: LSW-Theorie	63
2.3.4. Molekularer Mechanismus der Eisaffinität	69
2.3.5. Antigefrier(glyko)proteine.....	72
2.4. (Mikroskopische) Methoden zur Analyse der Antigefrieraktivität	77
2.4.1. Eisaffinitätsaufreinigung.....	77
2.4.2. Aufbau des Kryomikroskops	80
2.4.3. Eisstrukturierung	82
2.4.4. Eisrekristallisationsinhibierung (IRI).....	83
2.4.5. Thermische Hysterese (TH).....	87
2.5. Spektroskopie an Biomolekülen	93
2.5.1. ATR-FTIR-Spektroskopie.....	93
2.5.2. UV-VIS-Spektroskopie	98
2.6. Gelelektrophorese	101
2.6.1. SDS-PAGE	101
2.6.2. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis	104
2.7. Duale Funktion molekularer Eisnukleatoren und -inhibitoren	107
3. Ergebnisse und Interpretation	111
3.1. Birkenpollen.....	111
3.1.1. Heterogener Eisnukleator aus Birkenpollen.....	112
3.1.2. Antigefrieraktivität von Makromolekülen aus Birkenpollen	123
3.1.3. Analytik an Birkenpollen-Makromolekülen	131
3.1.4. Pollen als Eisnukleatoren und Antigefriersubstanzen	137
3.1.5. Zusammenfassung Birkenpollen.....	139

3.2. Mortierella alpina	143
3.2.1. Charakterisierung des heterogenen Eisnukleators aus M. alpina.....	145
3.2.2. Antigefrieraktivität von M. alpina.....	149
3.2.3. IR-Analytik an M. alpina.....	155
3.2.4. Zusammenfassung M. alpina.....	157
3.3. Antigefrierprotein aus Tenebrio molitor	159
3.3.1. Eisrekristallisationsinhibierung von TmAFP.....	161
3.3.2. Bestimmung der Thermischen Hysterese von TmAFP.....	166
3.3.3. Untersuchungen zur Eisnukleationsaktivität von TmAFP.....	175
3.3.4. Zusammenfassung TmAFP.....	178
3.4. Zusammenhang zwischen Molekülgröße und Eisnukleations- oder Antigefrieraktivität	181
Literaturverzeichnis	183
Anhang	203
A.1. Korrekturfunktionen für K(T)	203
A.2. Bestimmung der eisanteilkorrigierten Ratenkonstanten	204
A.3. Primärsequenz von TmAFP	206
A.4. Erfassung der Thermischen Hysterese mittels DSC	206
A.4.1. Messprozedur.....	206
A.4.2. TH-Messung am Beispiel von AFGP 1-5.....	208
A.4.3. Probenpräparation.....	210
A.4.4. TH-Messungen am DSC: IAP2 #C und MBP-TmAFP.....	210
A.5. Modifizierte Eisaffinitätsaufreinigung am Rotationsverdampfer	214
A.6. Größenverteilung der DSC-Emulsionströpfchen	216
A.7. Absorptionsbanden sämtlicher Spektren und deren Zuordnung	218
A.7.1. UV-VIS von BPWW und IAP.....	218
A.7.2. IR-Spektren von BPWW.....	219
A.7.3. IR und UV-VIS von TmAFP.....	221
A.8. Chemische Strukturen der Referenzsubstanzen	224
A.9. Weitere Analytik an BPWW	225
A.10. Weitere spektroskopische Analytik und SDS-PAGE an M. alpina	228
A.10.1. SDS-PAGE mit M. alpina.....	230
A.10.2. UV-VIS-Spektren M. alpina.....	231
A.11. Ratenabhängigkeit der heterogenen Eisnukleation in BPWW	232
A.12. Vergleich zweier Messmethoden zur Erfassung der Thermischen Hysterese	235
Abkürzungsverzeichnis	237

Häufig verwendete Formelzeichen239

1. Einleitung und Motivation

Die Bildung und das Wachstum von Eis sind in natürlichen Systemen weitverbreitete Prozesse. Auf der einen Seite hat die Natur daher Moleküle hervorgebracht, die die Eisbildung durch heterogene Eisnukleation kontrolliert auslösen können, und auf der anderen Seite Moleküle, die das Wachstum von bestehenden Eiskristallen durch spezifische Adsorption aufzuhalten vermögen. Diese Eigenschaften der eisbindenden Moleküle spielen nicht nur für die Überlebensfähigkeit von lebenden Organismen bei tiefen Temperaturen eine wichtige Rolle, sondern beeinflussen bei Eintrag der Moleküle in die Atmosphäre auch die Wolkenbildung und damit sowohl den Strahlungshaushalt als auch die Niederschlagsbildung.

Atmosphärischen Wassertröpfchen können aufgrund ihrer Größe im Mikrometerbereich bis zu etwa -40 °C unterkühlt werden. In der Atmosphäre vorkommende Partikel oder Moleküle, die über Stabilisierung eines Eisembryos die Bildung von makroskopischen Eiskristallen in der Atmosphäre bei höheren Temperaturen bestimmen, haben damit weitreichende Auswirkungen auf das Erdklima. Zu den zahlreichen atmosphärischen Eisnukleatoren zählen neben anthropogenen Partikeln wie Ruß auch aus natürlichen Quellen stammende wie Mineralstäube oder biologische Partikel. In früheren Publikationen (Pummer et al., 2012; Fröhlich-Nowoisky et al., 2015) konnten wasserlösliche Makromoleküle für die Eisnukleationseigenschaften von Birkenpollen und den Pilzsporen *M. alpina* als verantwortlich aufgezeigt werden. Ergänzende Untersuchungen zur chemischen Charakterisierung der Eisnukleatoren erfolgten in dieser Arbeit über Eisnukleationsmessungen sowie mittels IR-Spektroskopie.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit der Frage nach einer möglichen, scheinbar gegensätzlichen Funktion der Eiskeime als Antigeftersubstanzen nachgegangen. Diese können durch Adsorption an einen Eiskristall dessen weiteres Wachstum hemmen, was sowohl in einer charakteristischen Strukturierung des Eiskristalls und einer Verlangsamung der Ostwald-Reifung in einem polykristallinen Eisfilm resultiert als auch zu einer nicht-kolligativen Gefrierpunktniedrigung führt. Diese wird als Thermische Hysterese bezeichnet, wodurch Organismen wie Polarfischen, Bakterien oder Insekten das Überleben bei tieferen Temperaturen ermöglicht wird.

Aufgrund der auf einem ähnlichen Mechanismus beruhenden Wechselwirkung der eisnukleierenden oder an Eis adsorbierenden Moleküle mit Eis kann eine duale Funktion dieser Moleküle vermutet werden. Diese wurde tatsächlich an einem Glykoprotein (Xu et al., 1998) und an einem Abschnitt eines eisnukleierenden Proteins (Kobashigawa et al., 2005) beobachtet und findet durch neuere Modellierungsstudien (Kuiper et al., 2015; Hudait et al., 2018b) Bestätigung.

Am Beispiel der eisnukleierenden Birkenpollen und *M. alpina* wurden Untersuchungen zur Beantwortung der Frage nach einer dualen Funktion durchgeführt. Außerdem wurde sich dieses Themas von der anderen Seite aus angenommen, indem neben ergänzenden Messungen zu der Antigefrieraktivität, wobei auch der Aufbau einer Messmethode zur Erfassung der Thermischen Hystereseaktivität zu nennen ist, eine mögliche Eisnukleationsaktivität des Antigefrierproteins aus der Mehlkäferlarve *Tenebrio molitor* (TmAFP) (Graham et al., 1997; Liou et al., 2000; Bar et al., 2008) überprüft wurde.

2. Theoretischer Hintergrund und experimentelle Methoden

In dieser Arbeit wurde sich den heterogenen Eisnukleationseigenschaften von biologischen Makromolekülen und deren Antigeфриereigenschaften gewidmet. Um zu verstehen, warum bei zwei zunächst vollkommen gegensätzlich klingenden Aktivitäten tatsächlich eine Gemeinsamkeit im Wirkmechanismus vorliegt, soll zunächst die Eisnukleation mittels der Klassischen Nukleationstheorie (**Kapitel 2.1.1**) nähergebracht werden. In dem die durch Partikel oder Moleküle ausgelöste heterogene Eisnukleation beschreibenden **Kapitel 2.1.2** werden Anforderungen an den Eiskeim auf physikochemischer und molekularer Ebene wiedergegeben. Die **Kapitel 2.3.1, 2.3.2** und **2.3.3** zeigen die Wirkung von Antigeфриersubstanzen auf, zu deren Adsorptionsmechanismus in **Kapitel 2.3.4** eine Übersicht gegeben wird, bevor im abschließenden **Abschnitt 2.7** auf den Dualismus der beiden Eigenschaften eingegangen wird.

Dieses **Kapitel 2** legt nicht nur die theoretischen Grundlagen der Eisnukleation und Antigeфриeraktivität dar, sondern beschreibt auch detailliert die in dieser Arbeit angewandten Messmethoden, um die Effizienz von potentiellen Eiskeimen (**2.2**) oder eiskristallwachstumshemmender Moleküle (**2.4**) nachzuweisen und darüber hinaus auch quantitativ auswerten zu können. Weitere experimentelle Methoden zur Charakterisierung der biologischen Makromoleküle werden in den Abschnitten **2.5 Spektroskopie an Biomolekülen** und **2.6 Gelelektrophorese** genannt.

2.1. Der Nukleationsprozess von Eis

Es ist seit der Beobachtung von Fahrenheit 1721 vor fast 300 Jahren bekannt, dass Wasser unter den thermodynamischen Schmelzpunkt T_m unterkühlt werden kann. Dabei ist flüssiges Wasser auch unterhalb von T_m existent, obwohl in diesem Temperaturbereich die feste, kristalline Phase die thermodynamisch begünstigte ist (Atkins and Paula, 2006). Dieser Zustand wird als **metastabil** bezeichnet, da er nicht wie der Kristall das absolute Minimum der Freien Enthalpie, sondern lediglich ein relatives Minimum einnimmt. In der unterkühlten Flüssigkeit kann jederzeit die Kristallisation einsetzen, was einen sogenannten **Nukleationsprozess** voraussetzt, der in **Kapitel 2.1.1** detailliert beschrieben wird. Durch zufällige Fluktuationen in der Dichte sammeln sich Wassermoleküle zu einem eisähnlichen Cluster an, der aufgrund deren thermischer Bewegung einer stetigen Änderung in der Größe ausgesetzt ist. Erreicht der Cluster dann eine kritische Größe, wächst er zu einem makroskopischen Kristall an, weil dieser Prozess mit einer Verringerung der Freien Enthalpie verknüpft ist. Dieser als **homogene Nukleation** bezeichnete Prozess findet in Abhängigkeit vom Volumen und der Kühlrate bei etwa $T_{\text{hom}} = -40 \text{ °C}$ statt (Pruppacher, 1995; Koop, 2004) und einer Übersättigung der Gasphase bezüglich der festen Phase von 140 %

(Kanji et al., 2017). In den Anfängen der Untersuchungen zur Unterkühlung von Wasser wurden zunächst Erschütterungen als Ursache für das Gefrieren beim Öffnen der Probegefäße vermutet. Spätere Experimente gaben den Hinweis, dass Verunreinigungen im Wasser der Auslöser dafür sein müssen (Vali, 1995). Diese Fremdpartikel werden als **Eiskeim** (engl.: **Ice Nucleus**; **IN**) bezeichnet und stabilisieren den Cluster an ihrer Oberfläche, sodass dieser sich bei kleineren Unterkühlungen oder kleineren Übersättigungen bilden kann (s. **Abbildung 2.1**). Die Temperatur, bei der die **heterogene Nukleation** einsetzt, wird analog mit T_{het} abgekürzt.

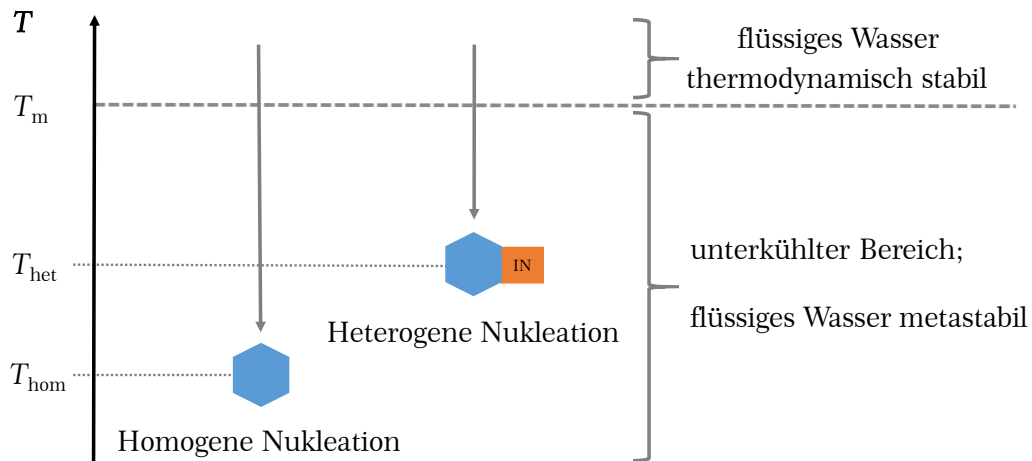


Abbildung 2.1: Im unterkühlten, metastabilen Wasser unterhalb der thermodynamischen Schmelztemperatur T_m kann die heterogene Nukleation durch einen vorhandenen Eiskeim (IN) bei geringeren Unterkühlungen (T_{het}) eintreten als die homogene Eisnukleation (T_{hom}). Abbildung nach (Koop, 2004).

2.1.1. Die Klassische Nukleationstheorie

Zur theoretischen Beschreibung der Nukleation in kondensierten Phasen wurde von Turnbull und Fisher (1949) die heute als **Klassische Nukleationstheorie** (engl. **Classical Nucleation Theorie**; **CNT**) bekannte thermodynamisch-kinetische Formulierung eingeführt. Auch in Pruppacher und Klett (1997) findet sich eine ausführliche theoretische Darlegung der homogenen und heterogenen Nukleation. Kleinere Überarbeitungen bezüglich der einzelnen Parameter erfolgen weiterhin und sind in aktuellen Publikationen nieder geschrieben (Murphy, D. M. and Koop, T., 2005; Zobrist et al., 2007; Koop, T. and Murray, B. J., 2016).

Die Verringerung der Freien Enthalpie bei der Bildung einer kristallinen bulk-Phase aus der flüssigen Phase ist die Triebkraft bei der Bildung von Eis aus Wasser bei einem charakteristischen Temperatur-Druck-Wertepaar. Dennoch kann flüssiges Wasser auch unterkühlt werden, weil die Bildung der neuen, festen Phase durch zufällige Ansammlung von Wassermolekülen, der Bildung des sogenannten Eisembryos, initiiert wird und aufgrund dessen sehr kleiner Größe und damit einhergehend stark gekrümmter Oberfläche Oberflächeneffekte eine große Rolle spielen (Koop, SoSe 2010b). Daher unterscheiden sich die Freie Enthalpie der Moleküle im Inneren (ΔG_v)

und an der Oberfläche (ΔG_o) dieses Clusters, sodass sich die **Freie Clusterbildungsenthalpie** ΔG_i aus der Summe dieser Freien Enthalpien zusammensetzt. Es ergibt sich eine Formulierung für ΔG_i in Abhängigkeit von dem **Radius** r_i des gebildeten Clusters, von dem **molekularen Volumen** $v_{\text{Eis}}(T)$ des Festkörpers, dem **Sättigungsverhältnis** $S(T)$ und der **Grenzflächenenergie** $\sigma_{\text{sl}}(T)$ zwischen dem Cluster und der Flüssigkeit, unter der Voraussetzung, dass der gebildete Embryo sphärische Gestalt besitzt und dessen Eigenschaften denen von makroskopischem Eis entsprechen.

$$\Delta G_i(T) = -\frac{4\pi \cdot k_B T \cdot \ln(S(T))}{3 \cdot v_{\text{Eis}}(T)} \cdot r_i^3 + 4\pi r_i^2 \cdot \sigma_{\text{sl}}(T) \quad (2.1)$$

Während der zweite Oberflächenterm immer einen positiven Wert besitzt und somit der Bildung eines Embryos entgegenwirkt, ist das Vorzeichen des ersten Terms abhängig von $S(T)$, das über die Dampfdrücke der unterkühlten, flüssigen (p_{liq}) und der festen Phase (p_{Eis}) den Sättigungsgrad der Flüssigkeit gegenüber dem Festkörper angibt.

$$S(T) = \frac{p_{\text{liq}}(T)}{p_{\text{Eis}}(T)} \quad (2.2)$$

Im unterkühlten Bereich ist der Dampfdruck des unterkühlten Wassers stets größer als der des in diesem Temperaturbereich thermodynamisch stabilen Eises (Murphy, D. M. and Koop, T., 2005), sodass $S(T)$ immer größer als 1 ist und der erste Term in **Gleichung (2.1)** einen negativen Wert annimmt. Somit ist die Bildung eines stabilen Clusters vom Radius r_i abhängig, wie in **Abbildung 2.2** dargestellt ist. ΔG_i durchläuft ein Maximum, das durch die **kritische Freie Clusterbildungsenergie** ΔG_{krit} (wenn $\partial \Delta G_i / \partial r_i = 0$) und den **kritischen Radius** r_{krit} charakterisiert ist.

$$\Delta G_{\text{krit}}(T) = -\frac{16\pi \cdot \sigma_{\text{sl}}(T)^3 \cdot v_{\text{Eis}}(T)^2}{3 \left(k_B T \cdot \ln(S(T)) \right)^2} \quad (2.3)$$

$$r_{\text{krit}}(T) = -\frac{2 \cdot \sigma_{\text{sl}}(T) \cdot v_{\text{Eis}}(T)}{k_B T \cdot \ln(S(T))} \quad (2.4)$$

Hat der gebildete Embryo subkritische Größe, zerfällt er wieder spontan ($\partial \Delta G_i / \partial r_i > 0$). Bei größeren Radien wird das Verhältnis der Oberfläche des Clusters zum Volumen kleiner, sodass die Bildung der neuen Phase ab dem kritischen Radius r_{krit} thermodynamisch begünstigt ist. Der hierbei relevante Parameter ist das den Anlagerungsprozess beschreibende Differential $\partial \Delta G_i / \partial r_i$, das oberhalb des kritischen Radius negativ wird ($\partial \Delta G_i / \partial r_i < 0$) und somit weiteres Wachstum irreversibel ist. Dieser Prozess wird als **Nukleation** bezeichnet, der Embryo kritischer Größe als **Keim** oder **Nukleus**. Ab einem bestimmten Radius wird die Freie Enthalpie ΔG des gesamten

Kristallisationsprozesses negativ und der Kristall die thermodynamisch stabilere Phase (Koop, SoSe 2010b).

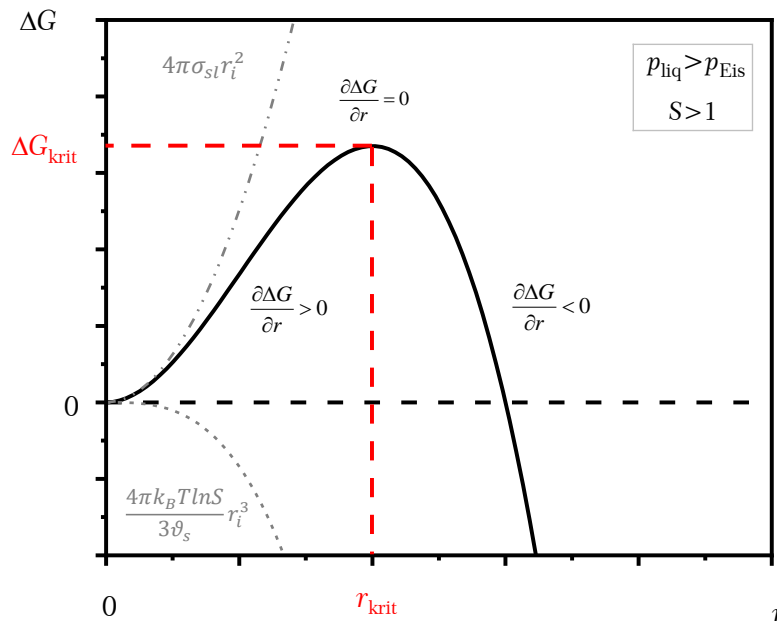


Abbildung 2.2: Die Freie Clusterbildungsenthalpie durchläuft bei einem kritischen Radius r_{krit} ein Maximum. Anlagerung eines einzigen weiteren Moleküls treibt das Wachstum des Clusters voran, da dieser Prozess nun mit einer Abnahme der Freien Enthalpie verknüpft ist ($\partial\Delta G_i/\partial r_i < 0$).

Diese Theorie beruht auf zahlreichen Annahmen und es bestehen Ungewissheiten in den Parametrisierungen für $v_{\text{Eis}}(T)$, p_{liq} , p_{Eis} und $\sigma_{\text{sl}}(T)$. Trotz der genannten Schwächen dient die Klassische Nukleationstheorie als theoretisches Hilfsmittel zum Verständnis des Nukleationsprozesses und zur Beschreibung der experimentellen Daten.

2.1.1.1 Der Nukleationsratenkoeffizient

Der kritische Radius r_{krit} wird nach **Gleichung (2.4)** durch die Temperatur T und den Sättigungsgrad $S(T)$ beeinflusst. Eine tiefere Temperatur geht dabei automatisch mit einer größeren Übersättigung einher, die wiederum bei einer bestimmten Temperatur über die Dampfdrücke regulierbar ist. Generell nehmen ΔG_{krit} und r_{krit} mit steigendem S ab, d.h. es bildet sich leichter ein Embryo kritischer Größe, der zudem aus einer geringer werdenden Anzahl an Molekülen besteht. Diese erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Entstehen eines Teilchens mit zunehmender Unterkühlung lässt sich mit einem **Nukleationsratenkoeffizienten** \mathcal{J} ausdrücken. Dieser beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein kritischer Keim bildet und dieser durch Anlagerung eines weiteren Moleküls weiter wächst, und ist daher eine Funktion der kritischen Freien Keimbildungsenthalpie $\Delta G_{\text{krit}}(\mathcal{T})$ und der Freien Diffusionsaktivierungsenthalpie $\Delta G^\#(\mathcal{T})$ (Koop, SoSe 2010b).

Der Nukleationsratenkoeffizient für die homogene Nukleation J_{hom} [$\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$] wird als Produkt der durch die Boltzmannstatistik beschriebenen Anzahl an kritischen

Clustern bei einer bestimmten Temperatur und der diffusionsabhängigen Anlagerung an den kritischen Cluster erhalten. N_1 entspricht der Anzahl aller Moleküle im flüssigen Wasser ($\sim 3 \cdot 10^{22} \text{ cm}^{-3}$) und bestimmt die Wahrscheinlichkeit, mit der Moleküle sich zu einem kritischen Cluster zusammenfinden.

$$J_{\text{hom}}(T) = N_1 \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{krit}}(T)}{k_B T}\right) \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot \exp\left(\frac{\Delta G^\#(T)}{k_B T}\right) \quad (2.5)$$

Mit abnehmender Temperatur wird die Freie Keimbildungsenthalpie $\Delta G_{\text{krit}}(T)$ kleiner, was einen Anstieg in J_{hom} zur Folge hat, zumal die gegenläufige Temperaturabhängigkeit von $\Delta G^\#(T)$ weniger stark ausgeprägt ist (Pruppacher, H. R. and Klett, J. D., 1997; Zobrist et al., 2007). Das bedeutet eine Steigerung der Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines Nukleationsereignisses bei sinkender Temperatur. Als grober Richtwert kann eine Änderung des Ratenkoeffizienten um 1.5 Größenordnungen bei einer Temperaturänderung von 1 °C angenommen werden (Pruppacher, H. R. and Klett, J. D., 1997). Bei tiefen Temperaturen unterhalb von -43 °C (230 K) könnte sich nach einer neueren Parametrisierung die Temperaturabhängigkeit von J aufgrund der gegenläufigen Temperaturabhängigkeit der Diffusionsaktivierungsenthalpie umkehren (Koop, T. and Murray, B. J., 2016). Außerdem steigt die Wahrscheinlichkeit einer Dichtefluktuation, was gleichbedeutend mit einer Erhöhung der Nukleationsrate $\omega_{\text{hom}} [\text{s}^{-1}]$ ist, je größer das Volumen V und je länger das System einer bestimmten Temperaturänderung ausgesetzt ist. Bei einer kleineren Kühlrate β kann das System also weniger stark unterkühlt werden als bei einer höheren.

$$\omega_{\text{hom}}(T) = J_{\text{hom}}(T) \cdot V \quad (2.6)$$

In Pruppacher, 1995 und daran angelehnt in Koop (2004) finden sich graphische Darstellungen von J als Funktion der Temperatur für verschiedene Tropfenvolumina und Kühlraten. Beispielhaft hat ein 1 μm großes Tröpfchen eine homogene Median-Nukleationstemperatur von $T_{\text{hom},50} \sim -39 \text{ °C}$ (234 K) bei einer Kühlrate von -1 °C min^{-1} mit einem Wert von $J \sim 10^{11} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$, während eine Erhöhung des Tröpfchenvolumens auf 10 μm bei gleichbleibender Kühlrate $T_{\text{hom},50}$ auf $\sim -37 \text{ °C}$ (236 K) heraufsetzt. Eine Verringerung der Kühlrate auf -0.1 °C min^{-1} für einen 1 μm -Tropfen hat eine ähnliche Auswirkung auf die homogene Nukleationstemperatur.

Desweiteren müsste J als Funktion der Konzentration von gelösten Substanzen aufgrund deren gefrierpunktserniedrigenden Effektes angegeben werden. Zu diesem Thema wird auf [Kapitel 2.1.4](#) verwiesen.

2.1.1.2 Statistik des Nukleationsprozesses

Ein wesentliches Merkmal für die homogene Nukleation ist neben der Temperaturabhängigkeit des Nukleationsprozesses dessen Zeitabhängigkeit, die darauf begründet ist, dass die Nukleation ein zufälliger Prozess ist, dem eine Dichtefluktuation von Molekülen vorangeht. Mithilfe der Poissonstatistik kann die Zeitabhängigkeit theoretisch beschrieben werden (Koop, 1996; Koop et al., 1997). Demnach steigt die Wahrscheinlichkeit für ein Nukleationsereignis exponentiell mit der Zeit mit einer temperaturabhängigen Nukleationsrate. Mit abnehmender Temperatur verringert sich die Nukleationszeit aufgrund der höheren Nukleationswahrscheinlichkeit.

Neben der grundlegenden Annahme eines stochastischen Prozesses wird außerdem angenommen, dass Nukleationsereignisse unabhängig voneinander sind und ein erfolgreiches Nukleationsereignis nicht von der Anzahl vorangegangener Versuche abhängt. Da das Eiswachstum in unterkühltem Wasser sehr schnell abläuft, kann die Bildung eines weiteren kritischen Clusters vernachlässigt werden (Vali, 1999). Die Wahrscheinlichkeit, k Nukleationsereignisse in einer Probe mit m Molekülen, von denen jedes während eines bestimmten Zeitintervalls mit der Wahrscheinlichkeit p zum Zentrum eines kritischen Keims werden kann, zu beobachten, kann mit der Binomialverteilung beschrieben werden. Damit können Zufallsexperimente mit nur zwei sich gegenseitig ausschließenden möglichen Ergebnissen beschrieben werden (Papula, 2006), in diesem Fall "gefroren" oder "nicht gefroren". Für kleine Wahrscheinlichkeiten $p \ll 1$ kann diese zu der Poissonverteilung (2.7) vereinfacht werden und eine Nukleationsrate ω_{hom} , die die Wahrscheinlichkeit für ein Nukleationsereignis angibt, eingeführt werden. Die Nukleationsrate für ein einzelnes Molekül wird dabei durch p/t dargestellt (Koop, 1996).

$$P_k(t) = \frac{(mp)^k}{k!} \cdot e^{-mp} \quad (2.7)$$

$$\frac{p}{t} \cdot m = \omega_{\text{hom}}(t) \quad (2.8)$$

Für den Fall, dass in einer Beobachtungszeit t kein Nukleationsereignis ($k = 0$) eintritt, also die Probe weiterhin flüssig ist, vereinfacht sich die Wahrscheinlichkeitsfunktion zu einer einfachen Exponentialfunktion.

$$P_0(t) = e^{-\omega t} \quad (2.9)$$

Angewendet auf eine mehrere Proben bzw. wiederholte Experimente umfassende Messung kann bei Kenntnis des Anteils der nach einer Zeit t noch flüssigen Tropfen n_{liq} in einer Probe mit n_{tot} Tropfen während einer Gesamtbeobachtungszeit t_{tot} die Nukleationsrate ω_{hom} folgendermaßen definiert werden (Koop, 1996).

$$P_0(t) = e^{-\omega t} \equiv \frac{n_{\text{liq}}(t)}{n_{\text{tot}}} \quad (2.10)$$

$$\omega_{\text{hom}}(t) = \frac{n_{\text{Eis}}(t)}{t_{\text{tot}}} \quad (2.11)$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass zu einer Zeit t ein Tropfen noch flüssig ist, nimmt demnach mit zunehmender Zeit exponentiell ab. Gleichzeitig nimmt die durch ω_{hom} ausgedrückte Nukleationswahrscheinlichkeit, die das Auftreten gefrorener Tropfen n_{Eis} widerspiegelt, exponentiell zu.

Experimente bei einer konstanten Temperatur lassen über die zeitliche Verteilung der Nukleationsereignisse Rückschlüsse auf die stochastische Natur des Nukleationsprozesses zu. Auch über Messungen mit variierender Kühlrate β kann die Stochastik des Prozesses gezeigt werden (Herbert et al., 2014; Budke, C. and Koop, T., 2015).

2.1.2. Heterogene Nukleation

Analog zu der homogenen Nukleation kann auch die heterogene Nukleation mit der klassischen Nukleationstheorie beschrieben werden und die Nukleationswahrscheinlichkeit über den **heterogenen Nukleationskoeffizienten** $j_{\text{het}}(T)$ ausgedrückt werden. Vorausgesetzt wird dabei analog zu der homogenen Nukleation ein stochastischer Charakter der heterogenen Nukleation, der sich durch Temperatur- und Zeitabhängigkeit äußert und in **Abschnitt 2.1.2.3** detailliert diskutiert wird. Durch die Anwesenheit eines Fremdpartikels wird eine Oberfläche dargeboten, an der die Bildung des kritischen Keims beginnen kann. Die Keimbildungsenergie $\Delta G_{\text{krit,het}}$ ist gegenüber der der homogenen Nukleation herabgesetzt, wenn die Grenzflächenenergie Eis-Keim, σ_{sn} , kleiner ist als die Grenzflächenenergie zwischen Eis (s) und der flüssigen Phase (l), σ_{sl} , sodass die Nukleation an der Oberfläche des Keims ausgelöst wird (s. **Abbildung 2.3**) (Koop, SoSe 2010b). Zudem stabilisiert der Eiskeim die neue feste Phase durch ein größeres Verhältnis des Volumens zu der Oberfläche des Eisclusters. Die für die homogene Nukleation formulierte kritische Freie Clusterbildungsenthalpie $\Delta G_{\text{krit,hom}}$ wird durch einen Faktor $f(m)$, wobei m ein Kompatibilitätsparameter ist, der über die Grenzflächenenergien oder über einen charakteristischen Kontaktwinkel α ausgedrückt wird, korrigiert. Dieser Kontaktwinkel entspricht dem Randwinkel der drei Phasen (Vali, 1999).

$$\Delta G_{\text{krit,het}} = \Delta G_{\text{krit,hom}} \cdot f(m) \quad (2.12)$$

$$f(m) = \frac{1}{4} \cdot (2 + m)(1 - m)^2 \quad (2.13)$$

$$m = \frac{\sigma_{\text{ln}} - \sigma_{\text{sn}}}{\sigma_{\text{ls}}} \quad \text{oder} \quad m = \cos(\alpha) \quad (2.14)$$

Es gilt für die Parameter folgender Wertebereich im Fall eines kugelförmigen Clusters:

$$0 \leq f(m) \leq 1$$

$$1 \geq m \geq -1$$

$$0^\circ \leq \alpha \leq 180^\circ$$

Je kleiner die Grenzflächenenergie σ_{sn} wird bzw. je mehr der Winkel α gegen 0° geht, desto mehr nähert sich m dem Wert 1 und $f(m)$ dem Wert 0. Dieses ist gleichbedeutend mit einer kleiner werdenden kritischen Freien Clusterbildungsenthalpie $\Delta G_{\text{krit,het}}$ und damit einer erhöhten Effizienz des immer eisähnlicher werdenden Eiskeims. Im Fall von $m = 1$ bzw. $f(m) = 0$ wäre die Oberfläche ein perfekter Eiskeim, da keine Nukleationsbarriere vorliegen würde. Das wäre zum Beispiel bei Vorliegen eines Eiskristalls der Fall.

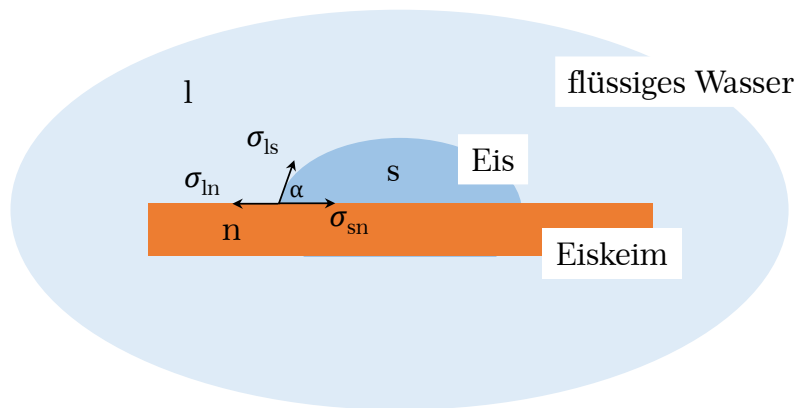


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der heterogenen Nukleation an einem Eiskeim (n), der hier vereinfacht durch ein Viereck repräsentiert ist. Ist die Grenzflächenenergie $\sigma_{sn} < \sigma_{sl}$, wird die Nukleation an der Keimoberfläche ausgelöst mit einem charakteristischen Kontaktwinkel α . Der Cluster ist als Kugelsegment dargestellt. Idee für die Abbildung entnommen aus (Koop, SoSe 2010b).

Erste theoretische Beschreibung der heterogenen Nukleation bezüglich des Kontaktwinkels und des Nukleationsratenkoeffizienten wurde auch hier schon in der Mitte des letzten Jahrhunderts erarbeitet (Turnbull, 1950; Fletcher, 1958). Der heterogene Nukleationsratenkoeffizient $j_{\text{het}}(T)$ lässt sich analog zu **Gleichung (2.5)** formulieren. Hierbei gibt N_s die Anzahldichte an Molekülen an der Wasser-Keim-Grenzfläche an. Da ein entferntes Molekül den Keim nicht spürt und demnach nicht beeinflusst wird, liegt der Wert in der Größenordnung 10^{15} cm^{-2} (Zobrist et al., 2007).

$$j_{\text{het}}(T) = \frac{N_s \cdot k_B \cdot T}{h} \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G_{\text{krit,het}}}{k_B \cdot T}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta G^\#}{k_B \cdot T}\right) \quad (2.15)$$

Außerdem lässt sich eine Gefrierate ω_{het} formulieren, die eine Abhängigkeit von der Größe der Oberfläche A des Keims aufweist.

$$\omega_{\text{het}}(T) = j_{\text{het}} \cdot A \quad (2.16)$$

Je aktiver der Eiskeim ist, was sich in einem kleineren Wert für $\Delta G_{\text{krit,het}}(T)$ und dem kritischen Radius $r_{\text{krit,het}}(T)$ äußert, desto größer wird j_{het} und damit die Wahrscheinlichkeit eines Nukleationsereignisses bei einer bestimmten Temperatur T . Ob die heterogene Nukleation der homogenen Nukleation bevorzugt ist, sodass die Nukleation bei einer höheren Temperatur $T_{\text{het}} > T_{\text{hom}}$ eintritt, wird auch von der Gesamtoberfläche A_{ges} des Eiskeims bestimmt. Bei zunehmender Konzentration des Eiskeims in einer Probeneinheit ist eine größere Gesamtfläche zur heterogenen Nukleation dargeboten, was zu einer höheren Gefrierwahrscheinlichkeit, ausgedrückt durch ω_{het} , führt. Relevant ist dabei die absolute Menge an aktiven Eiskeimen pro Tropfen, während dem Volumen des Tropfens keine Bedeutung beikommt. Die Art des Eiskeims bestimmt das Ausmaß der Begünstigung der heterogenen gegenüber der homogenen Nukleation.

2.1.2.1 Anforderungen an Eiskeime

Von Pruppacher und Klett (1997) wurden bestimmte Anforderungen aufgelistet, damit ein Partikel als effektiver Eiskeim angesehen werden kann. Mittlerweile ist bekannt, dass diese Punkte nicht generell Gültigkeit haben, sie sind aber für ein erstes Verständnis des möglichen Mechanismus bzw. Ableiten der aktiven Stelle des Eisnukleators von großem Nutzen. Zudem kann ein Partikel oder Molekül mit bekannter Struktur als potentieller Eiskeim ausgemacht werden.

Als generelle Voraussetzung wurde eine Wasserunlöslichkeit des als Eiskeim fungierenden Partikels genannt, was auf mineralische Stäube oder schlecht lösliche Salze wie Silberiodid zutrifft, allerdings die sehr gut wasserlöslichen molekularen Eisnukleatoren, die zu der Zeit der Publikation der Schrift weniger betrachtet wurden, vernachlässigt. Desweiteren ist aus der klassischen Nukleationstheorie abzuleiten, dass der heterogene Eiskeim eine Mindestgröße $r_{\text{krit,het}}$ besitzen muss, um die Eisnukleation oberhalb der homogenen Nukleationstemperatur auszulösen ($\sim > 1$ nm in einem Tropfen im Mikrometerbereich). Auf molekularer Ebene wird angenommen, dass funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Eiskeims wie Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylgruppen mit der Fähigkeit, Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, die Aktivität als Eiskeim bestärken. Als weitaus wichtiger als die chemische Natur wird eine näherungsweise Übereinstimmung der geometrischen Anordnung der Atome, Ionen oder Moleküle mit dem Kristallgitter von Eis angesehen, sodass die Adsorption von Wassermolekülen an diese vororientierte, eisähnliche Stelle erleichtert wird. Der klassische, mineralische Eiskeim Silberiodid weist tatsächlich eine Kristallstruktur ähnlich der von hexagonalem Eis auf (Vonnegut, 1947). Weiterhin wird vermutet, dass die Eisnukleation an einer definierten aktiven Stelle ausgelöst wird, die oben genannte Voraussetzungen erfüllt.

Eine detailliertere Diskussion bezüglich des molekularen Mechanismus bzw. der molekularen Voraussetzungen eines aktiven heterogenen (molekularen) Eisnukleators sind in **Kapitel 2.7** gegeben.

2.1.2.2 Modi der heterogenen Eisnukleation

Die heterogenen Eiskeime weisen vier verschiedene, atmosphärisch relevante Modi der Eisbildung auf, die schematisch in **Abbildung 2.4** veranschaulicht sind.

Beim **Depositionsgefrieren** muss eine Übersättigung der Gasphase bezüglich Eis ($S_{\text{Eis}} > 1$) vorliegen, damit an dem Eiskeim der Wasserdampf direkt in die feste Phase übergeht. Nach einer aktuelleren Publikation von Marcolli (2014) Marcolli sollte das Depositionsgefrieren als sogenanntes **pore condensation and freezing (pcf)** angesehen werden: Wasser kondensiert in eine Pore aufgrund des negativen Kelvin-Effekts bei einer Untersättigung bezüglich Wasser $S_{\text{liq}} < 1$. Gefriert es in der Pore bei Temperaturen unterhalb der homogenen Nukleationstemperatur auch bei Werten von $S_{\text{Eis}} < 1$, wächst das Eis durch Deposition, sobald die Übersättigung bezüglich Eis erreicht ist.

Liegt der Eiskeim in der wässrigen Phase suspendiert oder gelöst vor, kann in der unterkühlten Lösung bei einer dem Eiskeim entsprechenden Aktivierungstemperatur $T_{\text{nuk,I}}$ die Nukleation ausgelöst werden. Hierbei wird vom **Immersionsmodus** gesprochen. Besteht eine Übersättigung der Gasphase bezüglich des flüssigen Wassers ($S_{\text{liq}} > 1$), kondensiert zunächst Wasserdampf an dem Eiskeim, sobald der Taupunkt T_{tau} erreicht ist, sodass dieser nun von Wasser umgeben ist und wie beim Immersionsmodus die Nukleation auslösen kann (**Kondensationsgefrieren**). In der Atmosphärenchemie wird das Partikel, an dem Wasser kondensiert, auch als **Wolkenkondensationskeim (Cloud Condensation Nucleus: CCN)** bezeichnet. Ein geringer Anteil aller als CCN fungierenden Partikel kann ebenso als IN wirken. Die beiden Modi Kondensations- und Immersionsgefrieren können auch zusammen als **Immersionsgefrieren** bezeichnet werden.

Beim **Kontaktgefrieren** kommt es durch Auftreffen des Eiskeims auf einen flüssigen, unterkühlten Aerosoltropfen bei $T_{\text{nuk,Kt}}$ zur Nukleation. Die spezifischen Nukleationstemperaturen jedes einzelnen Nukleationsmodus können unterschiedlich sein (Cantrell, W. and Heymsfield, A., 2005). In der Regel kann gesagt werden, dass die Nukleation im Kontaktmodus bei höheren Temperaturen ausgelöst wird ($T_{\text{nuk,I}} < T_{\text{nuk,Kt}}$) (Vali, 1999).

Es wird angenommen, dass in Mischwolken, die sowohl unterkühlte als auch gefrorene Wassertröpfchen enthalten, zwischen 0 und -35 °C der Depositionsmodus von den genannten Mechanismen aufgrund der niedrigen Aktivierungstemperatur der am wenigsten relevante ist und dem Kondensations-/Immersions- und dem Kontaktmodus die größte Bedeutung beikommen (Lohmann, U. and Diehl, K., 2005; Hoose, C. and Möhler, O., 2012). Modellierungen von Hoose et al. (2010) weisen darauf hin, dass Immersionsgefrieren am meisten zu der heterogenen Nukleation in Mischwolken beiträgt. In Zirruswolken der oberen Troposphäre und unteren

Stratosphäre kommt dem Depositionsmodus für die Nukleation eine höhere Bedeutung zu (Hoose, C. and Möhler, O., 2012).

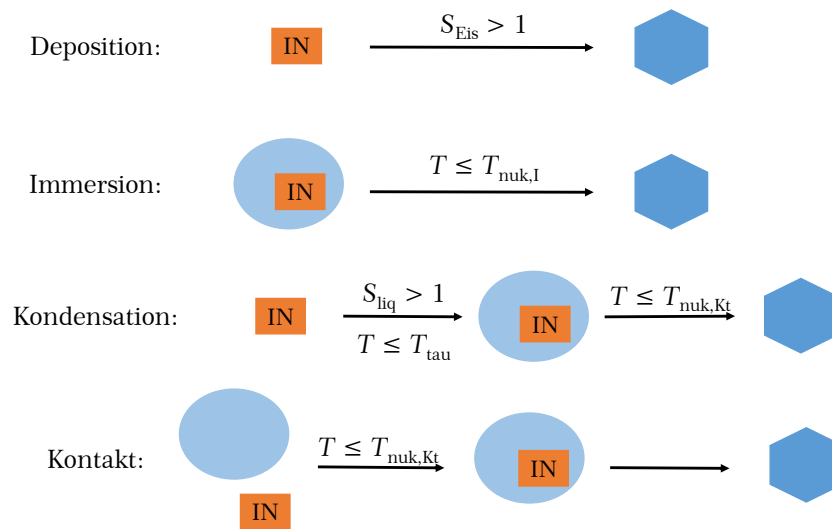


Abbildung 2.4: Die heterogene Nukleation wird in vier Modi unterschieden. Beim Depositionsgefrieren muss $S_{\text{Eis}} > 1$ sein, beim Immersionsgefrieren liegt der Eiskeim in der wässrigen Phase gelöst oder suspendiert vor, bevor der Tropfen bei $T_{\text{nuk,I}}$ gefriert. Der Kondensationsmodus bedeutet eine Kondensation von Wasser im ersten Schritt und anschließende Nukleation in der wässrigen Phase. Auch beim Kontakt des Eiskeims mit dem unterkühlten wässrigen Tropfen kann Nukleation ausgelöst werden. Abbildung neu bearbeitet nach (Vali, 1999).

2.1.2.3 Stochastisches und singuläres Modell

Die homogene Nukleation lässt sich als stochastischer Prozess auffassen, der in den Fluktuationen der Wassermoleküle, die zur Bildung des kritischen Eisembryos zusammenfinden müssen, begründet ist. Erste Arbeiten aus der Mitte des 20. Jahrhunderts (Bigg, 1953) zeigten neben der Volumenabhängigkeit auch eine Kühlratenabhängigkeit des Gefrierens wässriger Tröpfchen. Diese Beobachtung zeigt, dass die Komponente Zeit eine Rolle bei dem Prozess spielt, bei dem mit zunehmender Dauer des Experiments die Wahrscheinlichkeit eines Nukleationsereignisses steigt. Die Voraussetzung zur einfachen Beschreibung des stochastischen Charakters ist, dass alle betrachteten Einheiten dieselbe Nukleationswahrscheinlichkeit besitzen. Bei wässrigen Tropfen gleichen Volumens ist diese Bedingung erfüllt, sodass die homogene Nukleation über die Nukleationsrate ω_{hom} und den Nukleationsratenkoeffizienten J_{hom} beschrieben werden kann. Ob diese Annahme eines stochastischen Prozesses auch für die heterogene Nukleation gilt bzw. die heterogene Nukleation über die Nukleationsrate j_{het} ausgedrückt werden kann, ist seit langem Gegenstand von Diskussionen (Vali and Stansbury, 1966; Vali, 1970, 1994, 2008, 2014; Vonnegut, B. and Baldwin, M., 1983; Herbert et al., 2014; Budke, C. and Koop, T., 2015). Dagegen steht die singuläre Theorie mit der Annahme einer deterministischen Temperatur, bei der der Eiskeim die Nukleation des Tropfens

auslöst (Levine, 1950). Im Folgenden werden beide Theorien detaillierter beleuchtet und die mathematischen Formeln zu Beschreibung der Modelle dargelegt. Modifizierte Modelle der einfachen stochastischen (Marcolli et al., 2007; Niedermeier et al., 2011; Murray et al., 2011; Broadley et al., 2012) und singulären Hypothesen (Vali and Stansbury, 1966; Vali, 1994, 2008, 2014) beschreiben die Realität deutlich besser und werden im Folgenden ebenfalls dargelegt.

Stochastisches Modell

In dem einfachsten stochastischen Modell wird angenommen, dass jeder Keim identische Eigenschaften besitzt oder jede Einheit eine ausreichende Menge an Eiskeimen enthält, sodass sich deren unterschiedliche Qualitäten ausgleichen (Vali, 1994; Marcolli et al., 2007) und jeder Tropfen dieselbe heterogene Nukleationswahrscheinlichkeit hat. Mit diesem sogenannten Einkomponentenmodell (engl.: **single component stochastic (scs) model**) können Eiskeime wie Kaolinit (Murray et al., 2011), oder Silberiodid (Vonnegut, B. and Baldwin, M., 1983) gut beschrieben werden, da in zeitabhängigen Experimenten die Anzahl flüssiger Tropfen monoexponentiell abnimmt, wie nach **Gleichung (2.10)** für einen einfachen stochastischen, homogenen Prozess vorhergesagt ist.

$$n_{\text{fr}} = n_{\text{liq}} \cdot (1 - \exp(-j(T) \cdot A \cdot \delta t)) \quad (2.17)$$

Experimente mit anderen Eiskeimen zeigen dagegen eine multiexponentielle Abnahme der flüssigen Tropfen mit der Zeit (Murray et al., 2011; Broadley et al., 2012), was auf eine Verteilung von Eiskeimen bzw. aktiven Stellen mit jeweils eigenem Nukleationsratenkoeffizienten zwischen den Tropfen zurückgeführt werden kann. Für diese Eiskeime wie NX-Illit (Broadley et al., 2012), Arizona Test Dust (ATD) (Marcolli et al., 2007) oder Birkenpollen (Dreischmeier, 2013) lassen sich mit einem modifizierten Modell, dem **multiple component stochastic (mcs) model**, die Nukleationsraten $j_i(T)$ einer Klasse von äquivalenten Eiskeimen mit einer Oberfläche A_i über die in einem Zeitinkrement δt gefrorenen ($n_{\text{Eis},i}$) und noch flüssigen ($n_{\text{liq},i}$) Tropfen berechnen. Dabei wird angenommen, dass die Eiskeime inhomogen über die Tropfen verteilt sind. Diese Unterteilung des Gesamtsystems in einzelne Klassen ermöglicht eine Betrachtung des Systems analog zu **Gleichung (2.17)**. Durch Aufsummieren aller Tropfen wird das Gesamtsystem dargestellt (Herbert et al., 2014).

$$n_{\text{fr},i} = n_{\text{liq},i} \cdot (1 - \exp(-j_i(T) \cdot A_i \cdot \delta t)) \quad (2.18)$$

Weiterführende, auf der CNT basierende Modelle arbeiten zum Beispiel mit einer Verteilung der Kontaktwinkel der Eiskeime, um die Variation der Temperaturen zu erklären (Marcolli et al., 2007; Niedermeier et al., 2011).

Singuläres Modell

Nach dem singulären Modell wird die Nukleation an einer aktiven Stelle eines Eiskeims der Dimension des kritischen Radius bei einer kritischen Temperatur T_c ausgelöst (Vali and Stansbury, 1966). Dabei steigt die Nukleationswahrscheinlichkeit bzw. die -rate j_{het} bei der Temperatur T_c instantan auf 1 bzw. einen unendlichen Wert an, sodass für Temperaturen oberhalb der kritischen Temperatur T_c ($T > T_c$) $j_{\text{het}} = 0$ gilt, bei Erreichen dieser Temperatur ($T \leq T_c$) $j_{\text{het}} = \infty$ wird (Vali and Stansbury, 1966; Vali, 1994). Dieses ist gleichbedeutend mit einer Zeitunabhängigkeit des heterogenen Nukleationsprozesses, was den entscheidenden Unterschied zur stochastischen Theorie darstellt. Eine Variation der Abkühlrate sollte demnach keinen Einfluss auf die Anzahl an Nukleationsereignissen innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls haben. Bei Messungen mit konstant gehaltener Temperatur T_{konst} sollten nur die Tropfen, die Keime mit $T_c \geq T_{\text{konst}}$ enthalten, bei Erreichen der Temperatur gefrieren, aber über die Zeit keine weiteren Nukleationsereignisse beobachtet werden. Da immer der aktivste Keim, also der Keim mit dem höchsten T_c -Wert die Nukleation auslöst, hat eine Variation der Eiskeimaktivitäten zwischen den Tropfen eine Verteilung der Nukleationstemperaturen zur Folge. In dem Fall eines Konzentrationsverhältnisses, bei dem ein Eiskeim deutlich überwiegt, sind schlechtere Eiskeime in einer Probeneinheit nicht detektierbar.

Allerdings ist dieses vereinfachte Modell nicht geeignet, die experimentellen Beobachtungen zu deuten und zu beschreiben. Experimente, bei denen während des Kühlens über eine längere Zeit bei einer Temperatur angehalten wird, zeigen eine zwar reduzierte, aber von Null verschiedene Nukleationsrate während der Haltezeit, was auf eine Zeitabhängigkeit hindeutet (Vali, 1994). Diese wird verursacht durch die stochastische Natur des Embryowachstums, das den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in dem gesamten Gefrierprozess darstellt. Die Stochastik der heterogenen Nukleation ergibt sich auch aus der Abhängigkeit der Nukleationstemperatur von der Kühlrate, wie am Beispiel von Kaolinit, K-Feldspat oder Snomax® (Murray et al., 2011; Herbert et al., 2014; Budke, C. and Koop, T., 2015) gezeigt werden konnte. Die Temperaturabhängigkeit des Nukleationsprozesses äußert sich in einem exponentiellen Anstieg der Nukleationsrate mit sinkender Temperatur (Vali, 1994). Wiederholtes Einfrieren von Tropfen ergibt daher eine (geringe) Streuung der Nukleationstemperaturen von < 1 °C (Vali, 2008).

Schon 1966 wurde eine alternative Theorie vorgeschlagen (Vali and Stansbury, 1966), nach der die durch einen einzelnen Eiskeim ausgelöste Nukleation in einem engen Temperaturintervall um die für einen Eiskeim charakteristische Temperatur T_c stattfindet, da der Nukleationsratenkoeffizient in diesem Intervall rapide auf einen unendlichen Wert ansteigt (Vali, 1994, 2014). Die Nukleation an der aktiven Stelle des Eiskeims ist als stochastischer Prozess mit einer sehr stark ausgeprägten Temperaturabhängigkeit zu sehen. Aufgrund dieses engen Temperaturintervalls zeigt sich in zeitabhängigen Experimenten eine nur gering ausgeprägte Zeitabhängigkeit,

da die Nukleationswahrscheinlichkeit bei einer Haltetemperatur $T_{\text{konst}} > T_c$ sehr schnell geringer wird mit zunehmendem Abstand ΔT .

Das Temperaturintervall, in dem der Nukleationsratenkoeffizient einen für die Nukleation hinreichend großen Wert erreicht, ist deutlich kleiner als der Temperaturbereich der charakteristischen Temperaturen einzelner Eiskeime, sodass in diesem Modell der Keim mit dem höchsten T_c -Wert verantwortlich für das Gefrieren eines Tropfens ist. Je höher die Konzentration an Eiskeimen in einem Tropfen, umso wahrscheinlicher ist das Auftreten eines guten Eiskeims bzw. einer aktiven Stelle mit einem hohen T_c , sodass die Nukleationstemperatur des Tropfens höher ist.

In der Regel kann daher die Zeitabhängigkeit der heterogenen Nukleation eines Eiskeims als vernachlässigbar betrachtet werden unter Berücksichtigung der stärker ausgeprägten Variabilität zwischen den Eiskeimen, sodass die Eisknukleationsaktivität als einfache Funktion der Temperatur beschrieben werden kann. Dieses ist im [Anhang A.11](#) am Beispiel der Birkenpollen-Eisknukleatoren gezeigt.

Zur mathematischen Beschreibung als Ersatz der Klassischen Nukleationstheorie hat Vali 1970 das sogenannte **differentielle Keim-Spektrum** $k(T)$ eingeführt, mit dem sich die Konzentration von in einem Temperaturintervall dT aktiven Keimen pro Volumeneinheit V beschreiben lässt, indem der Anteil an gefrierenden Tropfen dn bezogen auf die Anzahl der bei der Temperatur T noch flüssigen Tropfen n_{liq} ermittelt wird.

$$k(T) = \frac{1}{V n_{\text{liq}}(T)} \frac{dn}{dT} \quad (2.19)$$

Integration liefert das sogenannte **kumulative Keimspektrum** $K(T)$, welches die gesamte Anzahl an aktiven Eiskeimen oberhalb der Temperatur T pro Volumeneinheit angibt über die Bestimmung des kumulativen Anteils an gefrorenen Tropfen, $f_{\text{Eis}} = n_{\text{Eis}}/n_{\text{tot}}$, der aus der Anzahl der bis zu der Temperatur T gefrorenen Tropfen n_{Eis} pro Gesamtzahl n_{tot} an Tropfen berechnet wird.

$$K(T) = \frac{\ln(n_{\text{tot}}) - \ln(n_{\text{liq}}(T))}{V} = \frac{\ln\left(\frac{n_{\text{tot}}}{n_{\text{liq}}}\right)}{V} = -\frac{\ln\left(\frac{n_{\text{liq}}}{n_{\text{tot}}}\right)}{V} = -\frac{\ln\left(1 - \frac{n_{\text{Eis}}}{n_{\text{tot}}}\right)}{V} \quad (2.20)$$

$$K(T) = -\frac{\ln(1 - f_{\text{Eis}}(T))}{V}$$

Die Darstellung der Nukleationskurven $f_{\text{Eis}}(T)$ als kumulative Keimspektren in der Form der [Gleichungen \(2.21\), \(2.22\) und \(2.23\)](#) hat sich in der Eisknukleations-Gemeinschaft etabliert (Murray et al., 2012; Budke, C. and Koop, T., 2015; Wex et al., 2015; Pummer et al., 2015; Hiranuma et al., 2015; Tobo, 2016; O'Sullivan et al., 2015; Reicher et al., 2017; Dreischmeier et al., 2017; Felgitsch et al., 2018). Die Daten sind über einen breiten Konzentrations- und Temperaturbereich in einem Diagramm

zugänglich und die Information bezüglich der aktiven Eiskeime pro Masse ($n_m(T)$ [g^{-1}]), pro Oberfläche ($n_s(T)$ [cm^{-2}]) oder pro Partikel ($n_n(T)$) eisnukleierendes Material ist direkt ablesbar.

$$n_m(T) = -\frac{\ln(1 - f_{\text{Eis}})}{V \cdot c_m} \quad \text{mit} \quad c_m \cdot V = m_{\text{ges,Tr}} \quad (2.21)$$

$$n_n(T) = -\frac{\ln(1 - f_{\text{Eis}})}{V \cdot c_n} \quad \text{mit} \quad c_n \cdot V = N_{\text{ges,Tr}} \quad (2.22)$$

$$n_s(T) = -\frac{\ln(1 - f_{\text{Eis}})}{V \cdot c_m \cdot A_{\text{IN}}} \quad \text{mit} \quad c_m \cdot V \cdot A_{\text{IN}} = A_{\text{ges,Tr}} \quad (2.23)$$

2.1.3. Heterogene Eisnukleatoren in natürlichen Systemen

Wasser ist die einzige chemische Verbindung auf der Erde, die natürlich in den drei Phasenzuständen fest, flüssig und gasförmig vorkommt. Sowohl auf atmosphärische Prozesse als auch bei Vorgängen in der Biosphäre hat der Phasenzustand von Wasser einen enormen Einfluss, wobei dem Phasenübergang vom flüssigen zu festem Wasser eine hohe Bedeutung zukommt. Viele in der Natur vorkommende oder aus anthropogenen Quellen stammende Partikel oder Moleküle können das Gefrieren durch heterogene Eisnukleation auslösen mit Auswirkungen einerseits auf klimatische Faktoren, die in [Kapitel 2.1.3.1](#) dargelegt werden, und andererseits auf die Überlebensfähigkeit von lebenden Organismen bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes von Eis, was in [Abschnitt 2.1.3.2](#) angesprochen wird.

Kommerzielle Anwendungen von Eisnukleatoren finden sich etwa bei der Produktion von Kunstschnee mittels des aus dem Bakterium *Pseudomonas syringae* (*P. syringae*; **Ps**) stammenden proteinösen Nukleator **Snomax**[®] (Snomax(R)International, 2018; Ward and DeMott, 1989), bei künstlicher Wolkenbildung mit Silberiodid (ZEIT online, 2010; Epoch Times, 2018) oder bei dem kontrollierten Einfrieren von Zellen zur Kryokonservierung (Morris and Acton, 2013).

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf zwei potentiell atmosphärisch relevanten heterogenen Eisnukleatoren biologischen Ursprungs, den Pollen (*Birke*) und Pilzsporen (*Mortierella alpina*). Die bisherigen, publizierten Forschungsergebnisse werden in [Kapitel 2.1.3.2](#) präsentiert, und in den [Auswertungskapiteln 3.1](#) und [3.2](#) werden die darauf aufbauenden Ergebnisse dieser Arbeit dargelegt.

2.1.3.1 Heterogene Eiskeime in der Atmosphäre

Die mittlere globale Temperatur der Erde liegt aufgrund des natürlichen Treibhauseffekts bei +15 °C (288 K) mit einem Luftdruck von etwa 1.013 bar auf der Erdoberfläche (NASA, 1976). Die relative Luftfeuchtigkeit variiert innerhalb der ersten Atmosphärenschicht, der Troposphäre, von etwa 60 % auf unterem Level bis

10 % an der Tropopause (Hegg and Baker, 2009). Die Temperatur in der Troposphäre nimmt mit steigender Höhe zur Tropopause kontinuierlich auf etwa -60 °C ab, wie in **Abbildung 2.5** erkennbar ist, da der wärmende Effekt der Erde durch die einfallende Sonnenstrahlung mit steigendem Abstand zur Oberfläche abnimmt. Die Höhe der Tropopause liegt bei etwa 8 km in den höheren Breitengraden und bei 18 km in den Tropen (Koop, WiSe 2008/2009). Die 0 °C -Isotherme kann auf eine Höhe von über den Globus gemittelt $\sim 5\text{ km}$ festgelegt werden.

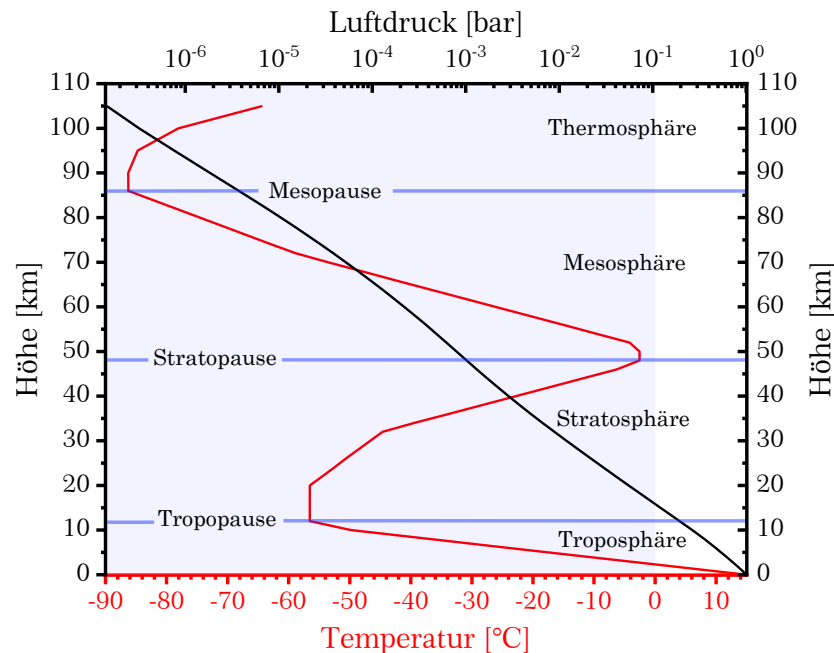


Abbildung 2.5: Die US-Standardatmosphäre von 1976 (NASA, 1976) zeigt den Verlauf der Temperatur (rote Kurve, untere x-Achse) und des Luftdrucks (schwarze Linie, obere x-Achse) mit der Höhe. Eingezeichnet sind die Bereiche (Pausen), in denen der Temperaturverlauf einen Wechsel erfährt sowie die unterschiedlichen Bezeichnungen der Sphären. Der blassblau unterlegte Bereich stellt den Temperaturbereich unterhalb von 0 °C dar, in dem Eisbildung stattfinden kann.

Aufgrund des Temperaturverlaufs ist eine gute vertikale Durchmischung der Troposphäre gewährleistet. Aufgrund der niedrigen Temperatur an der Tropopause und begünstigt durch in der Atmosphäre vorhandene Aerosolpartikel kondensiert Wasserdampf, sodass das Wetter vor allem in der Troposphäre durch Wolkenbildung bestimmt wird. An die Tropopause schließt sich die Stratosphäre mit einem inversen Temperaturverlauf aufgrund der im Ozon-Sauerstoff-Zyklus (Chapman-Zyklus) in Wärme umgewandelten Photonenergie des von der Sonne stammenden und für das Leben auf der Erde schädlichen UV-Lichts. Dieser als **Ozonschicht** bekannte Abschnitt der Atmosphäre liegt in etwa 20-40 km Höhe. Das Temperaturprofil hat eine schlechte Durchmischung der Stratosphäre zur Folge, weshalb nur der untere Bereich für die Wetterphänomene eine (geringe) Rolle spielt (Koop, WiSe 2008/2009). In der darüber liegenden Mesosphäre sinkt die Temperatur wieder ab, bis an der Mesopause die tiefste Temperatur mit weniger als -80 °C erreicht wird. In der Thermosphäre steigt die Temperatur an aufgrund der Absorption von energiereicher Strahlung durch Sauerstoff- und Stickstoffmoleküle.

Einfluss von Wolken auf den Strahlungs- und Wasserhaushalt

Aerosole sind in der Gasphase dispergierte flüssige Tröpfchen oder feste Partikel aus organischem oder anorganischem Material mit Größen von wenigen Nanometern bis Hunderten Mikrometern (Hegg and Baker, 2009). Dabei wird zwischen den primären Aerosolen, die aus natürlichen oder anthropogenen Quellen in die Atmosphäre eingetragen werden, und den sekundären Aerosolen, die durch chemische Prozesse in Atmosphäre entstehen, unterschieden. Sie haben einerseits Einfluss auf die Luftqualität und Sichtbarkeit sowie die menschliche Gesundheit und können andererseits das Energiegleichgewicht der Atmosphäre über Streuung und Absorption von elektromagnetischer Strahlung verändern und die Bildung und Eigenschaften von Wolken beeinflussen (Tang et al., 2016), die das Klima der Erde besonders bestimmen (Koop, 2013).

Der **direkte Aerosoleffekt** beschreibt das Rückstreuvermögen des Sonnenlichts, oder die Albedo, durch die Aerosolpartikel selbst, die daher in der Regel einen negativen Strahlungsantrieb besitzen (Koop, SoSe 2010a). Ausgenommen sind dabei schwarze Partikel wie etwa Ruß, die die Atmosphäre aufheizen. Wird eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 100 % erreicht, werden die Aerosolpartikel über Kondensation zu Wolkentropfen aktiviert. Durch erhöhte Konzentration an Aerosolen, die als Wolkenkondensationskeime wirken können, bilden sich viele kleine Tropfen, die in der Gesamtheit nicht nur zu einer erhöhten Rückstreuung beitragen, sondern auch aufgrund der geringeren Fallgeschwindigkeiten die Niederschlagsrate verringern. Diese Gegebenheit wird auch als **indirekter Aerosoleffekt** bezeichnet (Baker, 1997).

Die Wolken beeinflussen den Strahlungshaushalt der Erde, da sie durch Reflexion der einfallenden kurzwelligigen Sonnenstrahlung und Absorption der von der Erde abgestrahlten Infrarot-Strahlung sowohl einen negativen als auch einen positiven Klimaantrieb haben können. Dabei wird die absorbierte terrestrische Strahlung nach dem Planckschen Strahlungsgesetz (Atkins and Paula, 2006) gemäß der Temperatur der Wolke wieder zurückgestrahlt, analog zu dem Treibhauseffekt von Treibhausgasen (s. **Abbildung 2.6**). Weil die Wolken eine niedrigere Temperatur besitzen als die Erde, ist demnach die von ihnen ausgesendete Energiedichte geringer als die der einfallenden Sonnenstrahlung, sodass ein positiver Strahlungsantrieb vorliegt. Hochliegende Wolken mit niedriger Temperatur wie die Zirruswolken in der oberen Troposphäre und unteren Stratosphäre besitzen daher im Gesamten einen positiven Klimaantrieb, während bei tiefer liegenden Wolken wie den Cumulus- oder Nimbostratus-Wolken mit einer sich weniger von der Erdtemperatur unterscheidenden Temperatur der negative Klimaantrieb durch die Reflexion den positiven Antrieb überwiegt.

Bedeutung der kristallinen Phase in Wolken

Bei Temperaturen von $T \leq 0 \text{ °C}$ (273 K) und Sättigungsgraden von über 100 % bezüglich der kristallinen Eisphase können unterkühlte wässrige Tropfen durch homogene oder heterogene Eisnukleation gefrieren. Ohne Anwesenheit von Eiskeimen würden mikrometergroße, unterkühlte wässrige Aerosoltropfen erst unterhalb von -38 °C (235 K) und relativen Luftfeuchtigkeiten von über 140 % durch homogene Nukleation gefrieren (Kanji et al., 2017). In Abhängigkeit von der Konzentration und der Aktivität vorhandener heterogener Eiskeime können die unterkühlten Wassertropfen bei zum Teil deutlich höheren Temperaturen oder kleineren Übersättigungen bezüglich der kristallinen Phase nukleieren. Der Eisbildung kommt in der Atmosphäre eine wichtige Bedeutung zu, obwohl die Eisphase lediglich einen Bruchteil der gesamten kondensierten Phase darstellt (Cantrell, W. and Heymsfield, A., 2005). Neben den Strahlungseigenschaften wird auch der Wasserkreislauf der Erde von der Bildung der Eispartikel in den Wolken maßgeblich beeinflusst (DeMott, P. J. and Prenni, A. J., 2010). Von Interesse sind dabei zum einen die Zirruswolken der oberen Troposphäre und unteren Stratosphäre bei Temperaturen um -50 °C , die aufgrund der niedrigen Temperaturen immer aus Eispartikeln bestehen (Tang et al., 2016; Kanji et al., 2017). In Mischwolken der unteren und mittleren Troposphäre, welche bei Temperaturen oberhalb von etwa -37 °C (236 K) existieren, liegen flüssige und kristalline Phase nebeneinander vor. Aufgrund des sogenannten **Wegener-Bergeron-Findeisen-Prozesses** (WBF) wachsen die Eiskristalle, während die unterkühlten, wässrigen Tröpfchen aufgrund des höheren Dampfdrucks verschwinden (Pruppacher, H. R. and Klett, J. D., 1997). Als Folge entstehen Wolken mit wenigen, aber großen Eiskristallen, sodass die Lebenszeit der Wolke durch deren höheren Fallgeschwindigkeiten relativ zu den Aufwinden der Luft herabgesetzt ist, was sich in der Bildung von Niederschlag wie Regen oder Schnee äußert (Koop, 2013) (s. **Abbildung 2.6**). Mehr als die Hälfte des gesamten Niederschlags auf der Erde resultiert aus der Bildung von Eispartikeln (Knopf et al., 2018). Besonders über städtischen und landwirtschaftlich genutzten Gebieten mit großem Ausstoß an Partikeln wird der Niederschlag über die Bildung von Eiskristallen durch heterogene Nukleation ausgelöst (Kanji et al., 2017). Durch die Bildung der kondensierten wässrigen Phasen und anschließendes Entfernen des Wassers durch Ausregnen der Wolke fehlt in der Atmosphäre ein Anteil des Wasserdampfes als stärkstes Treibhausgas, was wiederum den Strahlungshaushalt der Atmosphäre beeinflusst (Kanji et al., 2017; Knopf et al., 2018). Da sowohl die Kondensation von Wasser als auch das Gefrieren exotherme Prozesse sind, werden durch das Freiwerden der latenten Wärme Winde und Gewitterwolken erzeugt (Murray et al., 2012).

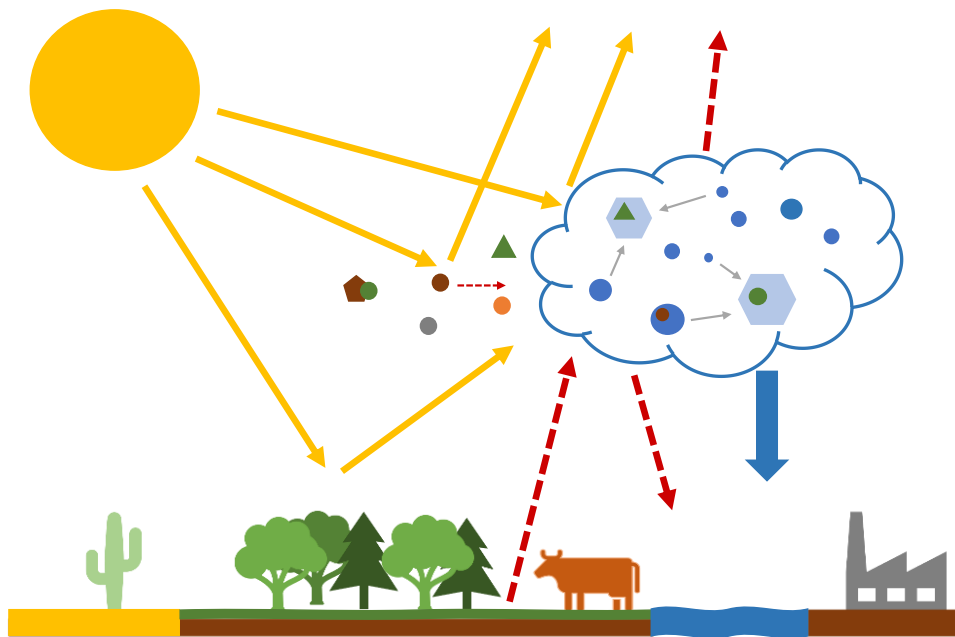


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der vielfältigen Einflüsse der von der Vegetation oder Industrie und Landwirtschaft emittierten Partikel, die als kreisförmige oder eckige Symbole dargestellt sind, auf atmosphärische Prozesse wie Niederschlagsbildung (blauer Pfeil) sowie Strahlungshaushalt (Reflexion: gelbe Pfeile; Wärmestrahlung: rote, gestrichelte Pfeile), ausgelöst durch heterogene Eisnukleation und angetrieben durch den WBF-Prozess (graue Pfeile).

Es werden die sehr komplexen Zusammenhänge deutlich zwischen der Konzentration an Aerosolpartikeln, die als Wolkenkondensationskeime fungieren können, dem eisnukleierenden Anteil dieser Partikel und deren Eisnukleationsaktivität auf der einen Seite sowie deren Einflüsse auf die Wolkenbildung und damit den Strahlungshaushalt und Niederschlagsereignisse auf der anderen Seite. Diese Umstände erschweren die Klimamodellierung und die Wettervorhersage, die auf grundlegendes theoretisches Verständnis und Informationen über die Bildung von Eiswolken durch unterschiedliche Arten von Eiskeimen angewiesen sind. Die Rolle der atmosphärischen Eisbildung im Klimasystem und im hydrologischen Zyklus ist von besonderem Interesse und weiterhin schlecht verstanden (Murray et al., 2012).

2.1.3.2 Eiskeime in biologischen Systemen

In der Biosphäre vorkommende, als heterogene Eisnukleatoren wirkende Partikel oder Moleküle können bei Eintrag in die Atmosphäre die Wolkenbildung beeinflussen und dadurch weitreichende Auswirkungen auf das Erdklima aufweisen. Darauf wurde in [Kapitel 2.1.3.1](#) detaillierter eingegangen und in [Abschnitt 2.1.3.4](#) wird zudem die Relevanz der biologischen Partikel für die atmosphärischen Prozesse erörtert.

Neben den aus anthropogenen Quellen der Biomassenverbrennung oder der Landwirtschaft produzierten organischen Substanzen, die in der Atmosphäre durch chemische Reaktionen wie Oxidation zu den eiskeimaktiven, sogenannten sekundären organischen Aerosolen (SOA) und bei niedrigen Luftfeuchtigkeiten zu

glasartigen Substanzen umgewandelt werden können, werden auch von lebenden Organismen wie Bakterien (z. B. Snomax®), Pollen (s.u.), Pilzsporen (s.u.), Moose (Moffett, 2015), Flechten (Kieft, T. L. and Ruscetti, T., 1990) oder marine Diatomeen (Kieselalgen) (Knopf et al., 2010; Wilson et al., 2015) Eisnukleatoren in die Umgebung eingetragen. Biologische Eiskeime nukleieren generell bei höheren Temperaturen mit unteren Grenzen von -20 °C oder gar -10 °C (Kanji et al., 2017). Die aktuelle Forschung beschäftigt sich einerseits mit der Untersuchung der Eisnukleationsaktivität potentieller, atmosphärisch relevanter Eiskeime natürlichen Ursprungs in diversen Nukleationsmodi mit zahlreichen, entwickelten Labormethoden und andererseits mit der räumlich-zeitlichen Erfassung der in der Atmosphäre vorkommenden Partikel sowie der Messung derer Konzentrationen (DeMott, P. J. and Prenni, A. J., 2010). Diverse Modellierungsstudien versuchen, die aus den Labor- und Feldmessungen gewonnenen Informationen mit theoretischen Parametrisierungen zu beschreiben, um möglicherweise Vorhersagen über Wolkenbildung und sogar die Einflüsse auf das Klima treffen zu können.

Pollen

Pollen oder Blütenstaub bestehen aus etwa $10 - 100\text{ }\mu\text{m}$ großen Pollenkörnern und dienen den Pflanzen zur durch Wind verholphenen Bestäubung und damit der Weiterverbreitung ihrer Art. Da deren atmosphärisches Vorkommen naheliegend ist, wurden in den letzten Jahren von den unterschiedlichsten Pflanzenarten zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Aktivität derer Pollen als (atmosphärische) Eiskeime durchgeführt (Diehl et al., 2002; Pummer et al., 2012; Dreischmeier et al., 2017; Gute and Abbatt, 2018), wobei sich die Birkenpollen als besonders aktiv erwiesen haben, weshalb sie häufig Gegenstand von diversen Studien sind (Augustin et al., 2013; O'Sullivan et al., 2015; Augustin-Bauditz et al., 2016; Dreischmeier et al., 2017; Gute and Abbatt, 2018; Tarn et al., 2018).

In den ersten Publikationen zu Pollen als potentielle eisnukleationsaktive Spezies wurden die Birken- und Erlenpollen als sehr aktive Pollenarten mit Nukleationstemperaturen von $T_{50} = -15\text{ °C}$ bzw. -13.5 °C im Immersionsmodus (0.35 mg ml^{-1} ; $250\text{-}380\text{ }\mu\text{m}$ -Tropfen) erkannt (Diehl et al., 2002; von Blohn et al., 2005). Wie in [Kapitel 2.1.2](#) beim Vergleich der unterschiedlichen Nukleationsmodi herausgestellt wurde, finden sich für den Kontaktodus höhere Nukleationstemperaturen von -13 °C (Birke) und -12.6 °C (Erle). Generell sind Pollen oberhalb von -20 °C als Eiskeime aktiv und damit zwar weniger effizient als Eisnukleatoren in Pilzen oder Bakterien ($T_{\text{nuk}} > -10\text{ °C}$), aber weitaus aktiver als etwa Mineralstäube oder Ruß ($T_{\text{nuk}} < -15\text{ °C}$). In einer älteren Studie von Diehl et al. (2001) Diehl et al. wurde die Pollenoberfläche mit den Kanten und Unebenheiten als eisnukleierende Lokalisation vermutet. In einer aktuelleren Publikation (Pummer et al., 2012) wurde aufgezeigt, dass für die heterogene Nukleation stattdessen leicht in Wasser zu lösende Makromoleküle, die von Oberfläche der Pollen abgespült werden

können, für die Wirkung als Eiskeim verantwortlich sind. Immersionsexperimente mit Waschwasser, aus dem die Pollenkörner entfernt wurden, zeigen gleiche Nukleationstemperaturen wie Pollenkörner enthaltene Wasser. So wird die Nukleation der die Pollenkörner der Birke beinhaltenden Probe bei -19 °C (254 K) ausgelöst, während das Waschwasser bei -18 °C (255 K) nukleiert, bei einem Temperaturfehler von etwa 1 °C . Weitergehende Experimente zeigen eine Unempfindlichkeit der Pollen bezüglich der Eiskeimaktivität gegenüber Temperaturstress. Erst bei einer Temperatur von $+142\text{ °C}$ (415 K) zeigt sich beispielhaft bei Birkenpollen eine Verschlechterung der Aktivität, die bei $+187\text{ °C}$ (460 K) vollständig eliminiert ist. Da zudem das denaturierende Guanidiniumchlorid (6 M) sowie die Proteasen Papain, Pronase und Trypsin sowie Lipase keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf die Nukleationstemperaturen zeigen, wurden sowohl ein Protein als auch ein Lipid als Eisnukleator ausgeschlossen. Allerdings werden die Untersuchungen zum Einfluss von Guanidiniumchlorid auf die Nukleationsaktivität von Pollen durch Experimente in dieser Arbeit und besonders von Stank (2018) Stank ad absurdum geführt (**Kapitel 3.1.1.1**). Reaktion mit Amylase, die $\alpha(1-4)$ -glykosidische Bindungen spaltet, sowie mit der die $\beta(1-4)$ -glykosidischen Bindungen von Cellulose spaltende Cellulase hat ebenfalls keine Auswirkungen auf die Nukleationsaktivitäten. Aufgrund der Tatsache, dass 0.3 M Borsäure die Anzahl aktiver Eiskeime auf 15% reduziert (Pummer et al., 2015), wird dennoch von einem Polysaccharid als dem für die Eisnukleation verantwortlichen Makromolekül ausgegangen. Es ist schon lange bekannt, dass Borsäure mit *cis*-ständigen Hydroxylgruppen auch hochmolekularer Verbindungen Komplexe eingeht (Deuel, H. und Neukom, H., 1949). Die Verringerung der Aktivität der eiskeimaktiven Moleküle durch Anwesenheit von Borsäure lässt daher darauf schließen, dass dieser Eisnukleator zahlreiche Hydroxylgruppen besitzt, die direkt, oder indirekt aufgrund der durch die Komplexbildung ausgelösten Strukturveränderung, in die Komplexbildung involviert sind. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass der mögliche Zucker eine andere glykosidische Verknüpfung als $(1-4)$ aufweist.

Experimente mit Zentrifugenfiltern definierter Porengröße geben Hinweis auf eine Größe der Eisnukleatoren zwischen 100 und 300 kDa , während bei einer Größenausschlusschromatographie die Fraktion $335 - 860\text{ kDa}$ das Maximum der Nukleationsaktivität aufweist, in der zudem kein UV-Signal bei der proteincharakteristischen Wellenlänge von 280 nm erkennbar ist (Pummer et al., 2015). Es ist darauf hinzuweisen, dass bei Letzterem eine breite Verteilung der Eiskeime aufgrund möglicher Adhäsion der Moleküle am Säulenmaterial beobachtet wurde. Untersuchungen von O'Sullivan et al. (2015) O'Sullivan et al. konnten den wasserlöslichen Charakter der Eiskeime von Birkenpollen bestätigen, da die Nukleationsaktivität bei Filtration durch einen 1000 kDa -Filter und einen $0.2\text{ }\mu\text{m}$ -Filter beibehalten werden konnte. Die Gesamtanzahl an Eiskeimen wurde auf 10^{12} pro Gramm Birkenpollen ($@T \sim -18\text{ °C}$) bzw. $8 \cdot 10^3$ pro Pollenkorn bestimmt, was mit dem Ergebnis von Augustin et al. (2013) Augustin et al. mit $2 \cdot 10^4$ IN pro Pollenkorn übereinstimmt. Diese Arbeitsgruppe hatte zudem die Beobachtung gemacht, dass

Birkenpollen aus verschiedenen Regionen Europas unterschiedliche Eisnukleationseigenschaften zeigen. Während die aus der Tschechischen Republik stammenden Birkenpollen einen Keim mit $T_{50} \sim -18$ °C enthalten, weisen die Schwedischen Birkenpollen zusätzlich einen bei niedrigeren Temperaturen um -23 °C nukleierenden Eiskeim auf.

Die Wirksamkeit der Pollen als Eisnukleatoren steht daher vermutlich im Zusammenhang mit ihrem geographischen Ursprung. Pollen von Pflanzen, die in Gegenden mit höheren Breitengraden zu finden sind, zeigen eine höhere Eiskeimaktivität. Damit ist auch zu erklären, warum Birken- oder Erlenpollen das Gefrieren bei geringeren Unterkühlungen auslösen als Mais- oder Zypressenpollen (Pummer, 2012). Zahlreiche der ersten im Kalenderjahr ausgestoßenen Pollenarten (Deutscher Wetterdienst, 2018) gehören zu den Eiskeimen mit höherer Nukleationsaktivität, sodass schon von Diehl et al. (2002) eine generelle Korrelation der Eisnukleationsaktivität mit dem Pollenflugzeitraum angenommen wurde, was wiederum einen Hinweis auf eine biologische Bedeutung der Eiskeime etwa in den sogenannten gefriertoleranten Organismen (s.u.) gibt. Auch eine frühere Arbeit von Schnell und Vali (1976) an zersetzenden Blättern zeigte eine Korrelation der Eiskeimaktivität mit den klimatischen Wachstumsbedingungen.

Fungi

Pilzsporen mit einer durchschnittlichen Größe von $2-10$ μm gehören zu den am häufigsten in der Atmosphäre vorkommenden biologischen Partikeln (Després et al., 2012). Sie werden durch natürliche Prozesse von den asexuellen Pilzen zur Fortpflanzung ausgestoßen. Einige Pilzarten vermehren sich bei feuchten Bedingungen über die dadurch ausgelöste Verbreitung der Sporen, andere dagegen lassen ihre Sporen bei trockenem Wetter durch Winde verteilen. In einer früheren Studie von Pummer et al. (2013a) wurden die zu den Schlauchpilzen (Ascomyceten) gehörenden *Fusarium avenaceum* mit einer Median-Nukleationstemperatur im Immersionsmodus von $T_{50} = -9$ °C (264 K) als sehr aktive Spezies entdeckt. Desweiteren wurden Pilzsporen der Gattung der Ständerpilze (Basidiomyceten) sowie das den Jochpilzen (Zygomyceten) zugeordnete *Mortierella alpina*, das besonders in Böden mit verwesenden organischen Bestandteilen lebt, mit einem sehr hohen T_{50} von -7 °C (266 K) und Onsettemperaturen von -5.5 °C als aktive Eisnukleatoren entdeckt (Fröhlich-Nowoisky et al., 2015).

Es wurde vermutet, dass in einem Großteil der eisnukleierenden Pilzsporen ein Protein die Nukleation auslöst, während bei Rostpilzen Polysaccharidgruppen in der Eisnukleationsaktivität involviert scheinen (Morris et al., 2013; Pummer et al., 2015). Experimente mit Zentrifugenfiltern weisen darauf hin, dass der von den Sporen leicht mit Wasser auswaschbare molekulare Eisnukleator eine Größe zwischen 100 und 300 kDa besitzt. Messungen von O'Sullivan et al. (2015) bestätigen diese Beobachtungen. Da die Eisnukleationsaktivität sowohl durch das chaotrope Reagenz Guanidiniumchlorid als auch bei Erhitzen auf $+98$ °C und durch

Behandlung mit der Protease Papain reduziert wird, wird von Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) Fröhlich-Nowoisky et al. auf ein Protein als Eiskeim geschlossen. Es ist dabei anzumerken, dass *M. alpina* der Klade A resistent gegenüber den Proteasen Papain und auch Pepsin ist, was mit einer anderen Aminosäure-Sequenz als bei den Kladen B, C und D oder mit einer nicht-proteinösen Schutzhülle erklärt wird. Aufgrund der Stabilität gegenüber 0.3 M Borsäure wurde hierbei ein Glykoprotein und allgemein ein Polysaccharid ausgeschlossen. Desweiteren spielen auch (Membran-)Lipide keine Rolle, da Lipase keinen Einfluss auf die Anzahl aktiver Keime (10^9 IN g^{-1}) hat. Einige dieser Beobachtungen und Interpretationen werden in dieser Arbeit analog zu den Ergebnissen zu den Birkenpollenexperimenten in der Auswertung **3.2.1** in Frage gestellt.

Funktion von Eisnukleatoren in biologischen Organismen

Die biologischen Eiskeime haben in ihren ursprünglichen Organismen spezifische Funktionen, die im Folgenden kurz erläutert werden. Einige Lebewesen schützen sich durch das Gefrieren des Wassers vor einer Austrocknung durch Verdampfen, da der Dampfdruck des Eises niedriger ist als der von flüssigem Wasser (Lundheim, 2002). Zudem führt die Eisbildung zu einer Herabsetzung des Energieumsatzes durch Verlangsamung des Metabolismus. Andere Eisnukleatoren mögen auch zufälligerweise eine eisnukleierende Eigenschaft besitzen, während sie für den Organismus andere wichtige Aufgaben aufweisen. Dieses wird auf Organismen, die besonders anfällig auf Gefrierprozesse reagieren, zutreffen. Im Fall von Pollen oder auch den lebenden Organismen wie Bakterien oder Pilzen wäre die durch die heterogene Eisnukleation in Wolken (**Kapitel 2.1.3.1**) und dem daraus resultierenden Niederschlag ermöglichte Verbreitung der genetischen Informationen zur Reproduktion eine denkbare Strategie (Pummer et al., 2015; Fröhlich-Nowoisky et al., 2016). Das Bakterium *P. syringae* mit Eisnukleationsaktivitäten bei -3.5 °C bzw. -8.5 °C (Budke, C. and Koop, T., 2015) stellt ein Beispiel von Lebewesen dar, die sich durch Gefrierschaden ihrer Wirtspflanze Nährstoffe aus der Pflanze beschaffen können (Lindow et al., 1982).

Desweiteren kann die durch den Eiskeim ausgelöste heterogene Eisnukleation dem Gefrierschutz in sogenannten **gefriertoleranten Organismen** dienen, indem in einem weniger empfindlichen Bereich, häufig dem extrazellulären Raum, das Gefrieren kontrolliert ausgelöst wird (Zachariassen, K. E. and Hammel, H. T., 1976; Lundheim, 2002). Als Folge der durch das Gefrieren bewirkten erhöhten Molalität strömt Wasser aus der Zelle in den extrazellulären Raum, weil ein Ausgleich des chemischen Potentials angestrebt wird, was wiederum die Konzentration in der Zelle herauf- und damit den Schmelzpunkt herabsetzt. Die Zellflüssigkeit ist nicht mehr unterkühlt und die Gefahr des Gefrierens somit verhindert. Würde im intrazellulären Raum das Wasser gefrieren, würden einerseits die gebildeten Eiskristalle die Zelle mechanisch zerstören und zweitens aufgrund des Wasserzuströms in die Zelle diese zerplatzen. Ein anderer Mechanismus der **Gefriertoleranz** besteht in der Freisetzung der latenten

Wärme, wodurch das System insgesamt auf eine Temperatur um 0 °C gesetzt wird, wie am Beispiel der Pflanze *Lobelia telekii* eindrucksvoll gezeigt ist (Krog et al., 1979). Die Gefriertoleranz wird von in mäßigeren Breiten lebenden Organismen bevorzugt, die im Tag-Nacht-Rhythmus den Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes ausgesetzt sind (Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E., 2000). Es sind dabei durchaus Korrelationen zwischen der Eisnukleationsaktivität, die den gefriertoleranten Organismen das Überleben sichert, und den klimatischen Bedingungen, unter denen die Organismen leben, zu erkennen (Pummer et al., 2012; Pummer et al., 2013a).

Andere Organismen nutzen eine andere Strategie, um sich bei tiefen Temperaturen zu schützen, die **Gefriervermeidung**. Diese kann sowohl über die vermehrte Bildung von den Gefrierpunkt herabsetzenden Substanzen wie Zucker oder Polyalkohole erfolgen oder über die Expression von eiskristallwachstumshemmenden **Antigefrierproteinen (AFP)** (Margesin et al., 2007). Deren Wirkmechanismus und Eigenschaften sowie die experimentellen Methoden zur Bestimmung der Antigefrieraktivität werden in den **Kapiteln 2.3** bzw. **2.4** ausführlich diskutiert und dargelegt.

2.1.3.3 Weitere heterogene Eisnukleatoren

Neben den im vorherigen **Kapitel 2.1.3.2** angesprochenen biologischen Eiskeimen wurden zahlreiche weitere als Eiskeime agierende Partikel natürlichen oder anthropogenen Ursprungs in der Natur und in der Atmosphäre gefunden. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Mineral- und Wüstenstäuben sowohl aus der Sahara, Gobi oder der arabischen Halbinsel als auch von trockenen Böden, Vulkanausbrüchen und landwirtschaftlichen Nutzflächen zu, da deren Eisnukleationsaktivität einen breiten Temperaturbereich umspannt und deren atmosphärisches Vorkommen mit einem jährlichen Eintrag von $>10^3$ Tg das der Bioaerosole (10^1 - 10^3 Tg a⁻¹) weit überschreitet (Kanji et al., 2017). Eine generelle Nukleationsaktivität liegt im Temperaturbereich unterhalb von -15 °C vor, jedoch können die Stäube in Abhängigkeit von der Zusammensetzung sowie Partikelgröße und -konzentration auch bei höheren Temperaturen nukleieren.

Zu den Mineralstäuben zählen K-Feldspat (KAlSi_3O_8 ; (Lide, 2005)), mit einem hohen Nukleationspotential bei $T > -15$ °C, Na-/Ca-Feldspat, Mikroklin (KAlSi_3O_8), das kleine Anteile von anderen Feldspäten oder Mineralien enthält, Illit ($\text{KAl}_4[\text{Si}_7\text{AlO}_{20}](\text{OH})_4$), Kaolinit ($\text{Al}_4\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_8$), Hämatit (Fe_2O_3), Quarz (SiO_2), Montmorillonit ($((0.5\text{Ca},\text{Na})_{0.7}(\text{Al},\text{Mg},\text{Fe})_4[(\text{Si},\text{Al})_8\text{O}_{20}](\text{OH})_4 \cdot n\text{H}_2\text{O})$), Calcit (CaCO_3), Gips (CaSO_4) oder NX-Illit, das sich neben dem Hauptbestandteil Illit aus weiteren Mineralien zusammensetzt (Tang et al., 2016; Kanji et al., 2017; Lide, 2005). Als Testsubstanz für Mineralstäube in Labormessungen hat sich Arizona Test Dust (ATD) etabliert, das eine Mischung aus Oxiden zahlreicher in den natürlichen Stäuben vorkommender Kationen bildet (Marcolli et al., 2007; Niedermeier et al., 2010).

Bodenstäube aus landwirtschaftlich genutzten Flächen tragen mit bis zu 25% zu dem globalen Staubeintrag bei und haben aufgrund der organischen Bestandteile sehr hohe Nukleationsaktivitäten auch oberhalb von -10 °C (Kanji et al., 2017). Auf die Bedeutung dieser eisnukleierenden organischen Komponenten für die Wolkenbildung wird im folgenden **Kapitel 2.1.3.4** detaillierter eingegangen.

Bei Vulkanausbrüchen werden ebenfalls zahlreiche Partikel in die Atmosphäre, mitunter sogar in die Stratosphäre, geschleudert. Ein derartiges Ereignis hatte schon mehrmals in der Geschichte der Erde drastische Auswirkungen auf das globale Klima aufgrund der sich bildenden Sulfataerosole, die wegen der geringen vertikalen Durchmischung in der Stratosphäre leicht über den Globus verteilt werden konnten und zu Temperaturerniedrigungen und lang anhaltenden Regenfällen führten. Die Angaben zur Eiskeimaktivität der Vulkanpartikel variieren von -13 bis -23 °C über $T_{50} < -28\text{ °C}$ bis zu einer Aktivität lediglich im Depositionsmodus bei $T < -38\text{ °C}$ am Beispiel von Vulkanstaub des im Jahr 2010 ausgebrochenen isländischen Vulkans Eyjafjallajökull (Kanji et al., 2017).

Als weitere atmosphärische Partikel, die potentiell als Eiskeime wirken können, sind Metalle oder Metalloxide aus ausschließlich anthropogenen Quellen wie der Luftfahrt oder städtischen Prozessen, kristalline Salze, die etwa aus Seesalzaerosolen durch Effloreszenz gebildet werden, organische oder glasartige Partikel sowie Ruß oder Asche aus Verbrennungsprozessen von Waldbränden oder Kohlekraftwerken zu nennen. Diese Partikel besitzen jedoch in der Regel eine eher geringe Nukleationsaktivität bei niedrigen Temperaturen, bei denen zudem die homogene Nukleation immer dominanter wird (Hoose, C. and Möhler, O., 2012; Kanji et al., 2017). Als Ausnahme unter den metallischen Eiskeimen gelten zum Beispiel Bleiodid (PbI_2) oder Silberiodid (AgI), die hohe Nukleationsaktivitäten oberhalb von -10 °C aufweisen (Vonnegut, 1947). Dem Silberiodid kommt dabei im Geoengineering zur kontrollierten künstlichen Wolkenbildung eine besondere Anwendung zu (ZEIT online, 2010; Epoch Times, 2018; Spektrum.de, 2018).

2.1.3.4 Atmosphärische Relevanz biologischer IN

Mineralstaubpartikel als in der Atmosphäre vorkommende und die mikrophysikalischen Prozesse und Strahlungseigenschaften beeinflussende potentielle Eiskeime sind seit Jahrzehnten Gegenstand der atmosphärischen Forschung (DeMott, P. J. and Prenni, A. J., 2010). Der Großteil dieser Partikel löst allerdings die heterogene Nukleation erst bei Temperaturen unterhalb von -20 °C aus, sodass für die Entstehung von Eiskristallen in Wolken besonders in der unteren Troposphäre, die wärmer als -15 °C sind, andere Substanzen verantwortlich sein müssen. Untersuchungen an aus der Atmosphäre direkt entnommenen Proben (Pratt et al., 2009) oder an in verschiedensten Orten auf der Welt eingesammeltem Schnee (Christner et al., 2008) weisen auf die Anwesenheit von biologischen Partikeln in den Niederschlag verursachenden Eiskristallen hin, was einerseits durch chemische Analysen und andererseits durch die in Labormessungen bestimmten

Nukleationstemperaturen oberhalb von -10 °C gezeigt werden konnte. Dabei zeigen die in der Antarktis, die frei von natürlicher Vegetation ist, gesammelten Proben einen Transport der über den Kontinenten ausgestoßenen Partikel über weite Distanzen und eine Erhaltung der Nukleationsaktivität. Zwar bestanden in der Untersuchung von Pratt et al. (Pratt et al., 2009) (2009) (Pratt et al., 2009) die Wolken über Wyoming, USA, zu einem Großteil von 50% aus Mineralstaubpartikeln, die biologischen Substanzen sind mit einem Anteil von etwa 30% ebenfalls nicht zu vernachlässigen. In einer anderen Feldmessung im östlichen Mittelmeerraum (Schrod et al., 2017) wurden dagegen fast ausschließlich Mineralstaubpartikel, die durch Winde aus der Wüste Sahara hereingetragen wurden, beobachtet.

Konzentrationen atmosphärischer Partikel

Viele Studien bemühen sich der Erfassung der Konzentrationen der potentiellen heterogenen Eisnukleatoren in der Atmosphäre sowie derer regionaler und zeitlicher Verteilungsmuster mit einem besonderen Fokus auf die mögliche Bedeutung der geringer konzentrierten, jedoch deutlich aktiveren biologischen Eisnukleatoren, um deren Rolle für Klima und Wolkenbildung besser verstehen zu können. Während die hohe Nukleationsaktivität durch zahlreiche Labormessungen unbestritten ist, gab und gibt es bezüglich der Anzahl an biologischen Partikeln in der Atmosphäre und der damit zusammenhängenden Relevanz für die Wolkenbildung viele Diskussionen und verschiedene Interpretationen (DeMott, P. J. and Prenni, A. J., 2010).

Eine ältere Modellierungsstudie von Hoose et al. (2010) kam zu dem Ergebnis, dass durch biologische Aerosole ausgelöste Niederschlagsbildung von eher geringer Bedeutung ist. Im Gegensatz zu Mineralstäuben mit 88% und Ruß mit 12 % wurde der Anteil von Bioaerosolen auf lediglich 5-10 % (davon 11 % Bakterien, 1 % Pilzsporen, 88 % Pollen) berechnet, der jedoch bei höheren Temperaturen und hohen Konzentrationen auf einen nicht mehr vernachlässigbaren Anteil von 0.6 % (98 % Bakterien, 2 % Pilzsporen) anwachsen könnte (Hoose, C. and Möhler, O., 2012).

Als grober Richtwert für die minimal notwendige Partikelkonzentration zur Niederschlagsbildung wurde $10^3 - 10^4\text{ m}^{-3}$ vorgeschlagen (DeMott, P. J. and Prenni, A. J., 2010). Die Konzentration der sogenannten primären biologischen Aerosolpartikel oder Bioaerosole mit Durchmessern größer als etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ liegt über Kontinenten bei etwa 10^4 m^{-3} und entspricht damit einem Anteil von $\sim 30\%$ über städtischen Gebieten und von sogar $\sim 80\%$ über den von menschlichen Aktivitäten unberührten Regenwäldern (Fröhlich-Nowoisky et al., 2016), die als Beispiel der Selbsthilfe der Natur besonders viele biologische Aerosole ausstoßen, da diese als CCN oder IN für den regenwaldeigenen Wasserkreislauf verantwortlich sind. Der globale Eintrag der Bioaerosole variiert in Abhängigkeit von der Lokalität zwischen 10^1 und 10^3 Tg a^{-1} . Im Gegensatz dazu werden jährlich etwa $2 \cdot 10^3\text{ Tg}$ (Tang et al., 2016) bis $5 \cdot 10^3\text{ Tg}$ (Kanji et al., 2017) Mineralstäube aus den großen Wüsten wie die Sahara und Gobi und bis zu $1.7 \cdot 10^4\text{ Tg}$ Seesalzaerosole (Tang et al., 2016) (Tang et al., 2016) emittiert, was der

Diskussion um den vernachlässigbaren Beitrag der biologischen Partikel als eisnukleierende Substanzen durchaus Nahrung gibt. Während die relativ kleinen Bakterien und Pilzsporen im unteren Mikrometerbereich höhere Anzahlkonzentrationen von 10^3 - 10^4 m^{-3} aufweisen, sind lediglich 10^1 m^{-3} Pollen vorhanden aufgrund ihrer erhöhten Sedimentationsgeschwindigkeit resultierend aus der Größe von etwa 10-100 μm , weshalb lediglich 40 % der Pollen bis in 2 km Höhe aufgetrieben werden (Després et al., 2012). In Abhängigkeit von der Gegend oder den klimatischen Bedingungen und der Jahreszeit können dennoch auch bis zu 10^4 m^{-3} Pollen gemessen werden (Manninen et al., 2014).

Diese Feldmessungen zeigen auf, dass die Konzentration der Bioaerosole durchaus ausreichend zur Niederschlagsbildung durch Eisnukleation sein kann. Weitere Erforschung von zeitlichen und räumlichen Konzentrationsmustern zur genauen Analyse der Relevanz verschiedener Eiskeime in atmosphärischen Prozessen ist von großer Notwendigkeit. Auch globale Veränderungen im Niederschlag, der CO_2 -Konzentration und Temperatur oder auch in der Landnutzung und durch Urbanisierung können einen Einfluss auf die Bildung und Verteilung von Bioaerosolen haben (Després et al., 2012).

Bedeutung wasserlöslicher Bestandteile der Bioaerosole

In neueren Studien wurde aufgezeigt, dass bei biologischen Partikeln wie Pollen, Pilzsporen und auch Bakterien nicht das gesamte Konstrukt, sondern leicht wasserlösliche Moleküle in der vierfachen Größenordnung die Eisnukleation auslösen (Pummer et al., 2012; Fröhlich-Nowoisky et al., 2015). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer weitaus höheren Eiskeimkonzentration biologischen Ursprungs als aus den Konzentrationsmessungen der Partikel vermutet würde. Diese biologischen Eisnukleatoren im Nano- bis Mikrometerbereich könnten in weitaus höhere Lagen der Atmosphäre aufgetrieben werden und dadurch größere atmosphärische Verweilzeiten besitzen als die Partikel, die in bisherigen Modellierungen berücksichtigt wurden. Die Nanopartikel bzw. Makromoleküle werden weniger direkt in die Atmosphäre eingetragen, sondern in Kombination mit Bodenstaubpartikeln, mit denen sie etwa durch Auswaschen bei Regenprozessen in Kontakt kommen (O'Sullivan et al., 2015). Besonders landwirtschaftlich genutzter Boden enthält deutlich mehr biologische Partikel als Mineralstäube aus unfruchtbaren Wüsten. Durch einen geschätzten Beitrag der von den Landwirtschaftsböden emittierten Partikel von 5% bis zu 25 % zu dem globalen Staubeintrag kommt den mit biologischem Material beladenen Partikeln eine neue Bedeutung zu, da durch die biologischen Komponenten die Eisnukleationsaktivität der Bodenstäube oberhalb von -15 °C bedeutend erhöht wird (Kanji et al., 2017). Durch anthropogene Aktivitäten begünstigte Winderosionsprozesse steigert sich der Eintrag der Stäube mitsamt der anhaftenden Partikel oder Moleküle biologischen Ursprungs (Conen et al., 2011; Hill et al., 2016). Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben sich mit der Fragestellung

beschäftigt, inwieweit die Eisnukleationsaktivität von Bodenstäuben aus fruchtbarem Land sich von den klassischen Mineralstäuben unterscheiden, im Hinblick auf mögliche Einflüsse auf atmosphärische Prozesse (Conen et al., 2011; Tobo et al., 2014; O'Sullivan et al., 2014; O'Sullivan et al., 2015; Augustin-Bauditz et al., 2016; Hill et al., 2016; O'Sullivan et al., 2016; Steinke et al., 2016). Der Beitrag der aus landwirtschaftlich genutzten Böden stammenden Bodenstäube zur atmosphärischen Eisnukleation könnte durch die Anwesenheit von organischen Bestandteilen weitaus relevanter sein als der von Mikroorganismen oder Pflanzen direkt eingetragenen Eiskeime.

Zusammengefasst kann abgeleitet werden, dass die in atmosphärischen Messungen dem Mineralstaub zugerechnete Beteiligung an der Eisnukleation überschätzt wurde, während die organischen Bestandteile möglicherweise aufgrund des geringen Massenanteils unterhalb des Detektionslimits lagen.

Generell ist ein Anstieg an Bioaerosolen während und im Anschluss an einen Regenschauer oder bei Erhöhung der relativen Luftfeuchtigkeit zu beobachten (Huffman et al., 2013; Hader et al., 2014; Wright et al., 2014; Wang et al., 2016; Helin et al., 2017). Joung und Buie (2015) und Wang et al. (2016) führten diese Beobachtung auch darauf zurück, dass auf den Boden auftreffende Regentropfen Submikrometer große Partikel losreißen und in die Luft eintragen. Desweiteren ist von Pollen bekannt, dass sie durch Wasseraufnahme (s. auch [Abbildung 2.7](#)) bei Erhöhung der Luftfeuchtigkeit oder durch Auswaschen bei einem Regenguss in zahlreiche Bruchstücke im Größenbereich von 30 nm - 5 μm (Després et al., 2012) zerbersten (Schäppi et al., 1999), wodurch es ebenfalls zu einem starken Anstieg an potentiellen Eisnukleatoren kommen kann. Eine Feldmessung von (Hader et al., 2014) nach einem Regenereignis konnte diese Hypothese nicht bestätigen, da gemessene Eiskeimkonzentrationen nicht in dem dann erwarteten Verhältnis zu den gemessenen Pollenkonzentrationen standen.

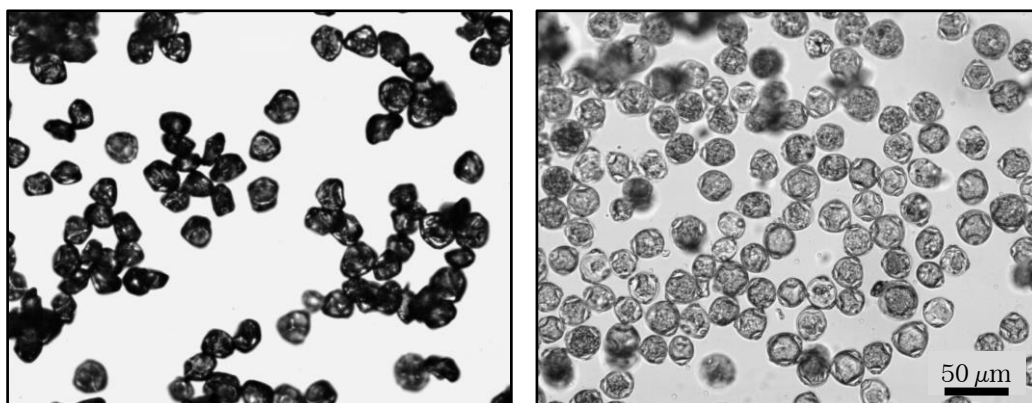


Abbildung 2.7: Mikroskopaufnahmen von Birkenpollen in trockenem Zustand (links) und in Wasser suspendiert (rechts). Ein Aufquellen der Pollen in Wasser ist erkennbar. Abbildung mit Änderung übernommen aus (Dreischmeier, 2013).

Die Generierung zahlreicher leicht wasserlöslicher Makromoleküle aus den Pollen oder Pilzsporen mit einem höheren Auftrieb und deutlich höheren atmosphärischen

Verweilzeiten, die zudem in Kombination mit Bodenstäuben in die Atmosphäre emittiert werden können, wurde in den letzten Jahren besonders intensiv erforscht. In künftigen Klima-Modellierungen könnte sich ein stärkerer Beitrag von Bioaerosolen zu der Wolkenbildung als ursprünglich angenommen ergeben.

Das in **Abbildung 2.8** aus dem Review-Artikel von Kanji et al. (2017) entnommene kumulative Eiskeimspektrum gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Temperaturbereiche, in denen die einzelnen heterogenen Eiskeimklassen nukleieren, sowie über die entsprechenden Konzentrationen (in L^{-1} Luftvolumen) der eisnukleationsaktiven Substanzen. Die biologischen Partikel (grün) lösen die Nukleation bei den höchsten Temperaturen unterhalb von -15 °C aus, werden aber bei tieferen Temperaturen von den bis zu drei Größenordnungen häufiger auftretenden Staubpartikeln (gelb, orange) überlagert. Die gesammelten Niederschlagsproben (grau) enthalten sämtliche beobachtete Eiskeime.

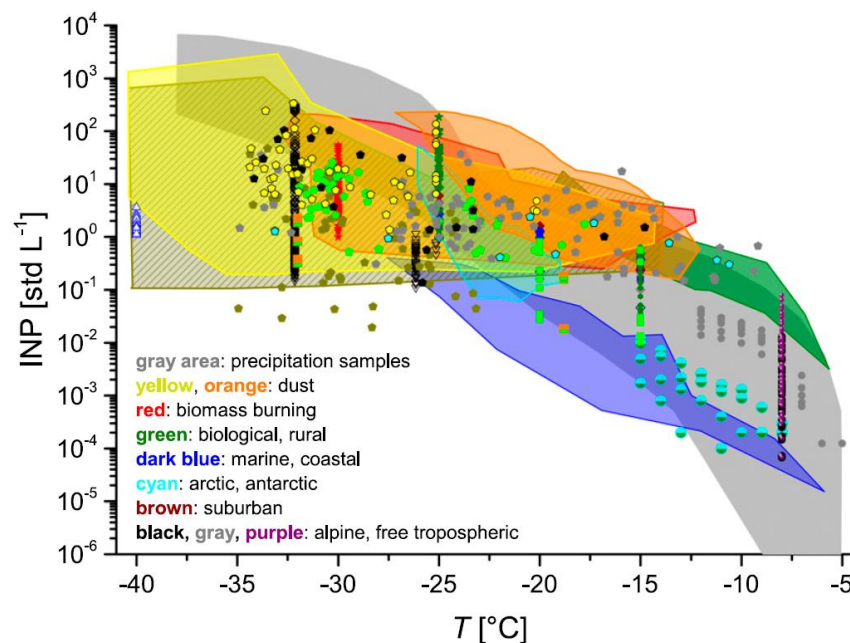


Abbildung 2.8: Kumulatives Eiskeimspektrum für sämtliche atmosphärische eisnukleierende Partikel, die in unterschiedliche Klassen unterteilt wurden. Abbildung aus Kanji et al. (2017) Kanji et al.

Generell beziehen sich die Eisnukleationsdaten wie die in **Abbildung 2.8** gezeigten aus Kanji et al. Kanji et al. (2017) auf reine wässrige Lösungen der Eiskeime. Da Eiskeime in der Atmosphäre in der Regel in wässrigen Lösungen mit Salzen oder organischen Substanzen vorliegen, sind die Untersuchungen der Eisnukleationsaktivität in Lösungen aufgrund der möglichen, nicht über die wasseraktivitätsbasierte Nukleationstheorie (s. **Kapitel 2.1.4**) vorhersagbaren Einflüsse auf die heterogenen Nukleationstemperaturen von großer Wichtigkeit.

2.1.4. Eisnukleation in wässrigen Lösungen: Wasseraktivitätsbasierte Eisnukleationstheorie

Die thermodynamische Schmelztemperatur einer wässrigen Lösung erniedrigt sich mit steigender Konzentration der gelösten Substanzen, wodurch auch die heterogene und homogene Nukleationstemperatur um einen mit der Erniedrigung der Schmelztemperatur korrelierenden Betrag herabgesetzt wird.

Die klassische Formulierung (**Gleichung (2.24)**), die für eine erste grobe Abschätzung des Schmelzpunktes einer Lösung bei Kenntnis der Konzentrationen der gelösten Stoffe durchaus geeignet ist, leitet sich aus der mathematischen Formulierung der Herabsetzung des chemischen Potentials einer Lösung relativ zu dem reinen Lösungsmittel ab unter der Annahme einer ideal verdünnten Lösung und gibt eine lineare Abhängigkeit der Schmelzpunkterniedrigung ΔT lediglich von der Konzentration, ausgedrückt durch die Molalität b_2 , dem van't Hoff-Faktor i und der lösungsmittelspezifischen Kryoskopischen Konstante K_{kr} (für Wasser: $K_{kr} = 1.86 \text{ K kg mol}^{-1}$ (Lide, 2005) an.

$$\Delta T = -K_{kr} \cdot b_2 \cdot i \quad (2.24)$$

Der van't Hoff-Faktor i (**Gleichung (2.25)**) berücksichtigt die mögliche Dissoziation von Salzen oder Molekülen in die ionischen Bestandteile. Für Moleküle im Dissoziationsgleichgewicht ist der Dissoziationsgrad α von Bedeutung, sodass i nicht direkt aus der Dissoziationszahl ν bestimmt werden kann.

$$i = 1 - \alpha(1 + \nu) \quad (2.25)$$

Entgegen dieser vereinfachten Betrachtung als kolligative Eigenschaft, wonach nur die Anzahl an gelöster Substanz und nicht deren chemische Eigenschaften eine Rolle spielen, ist die Abnahme der Schmelztemperatur in realen Lösungen besonders bei höheren Konzentrationen stoffspezifisch und nicht linear. Dieser Fakt äußert sich in einem Phasendiagramm, das die Schmelztemperaturen verschiedener wässriger Lösungen gegen die Konzentration, etwa in Form der Molalität oder des Massenbruchs, darstellt, in einer großen Variation der Schmelzkurven der unterschiedlichen Substanzen und in Abweichungen vom linearen Verhalten nach **Gleichung (2.24)** (s. **Abbildung 2.9a**).

Wird dagegen die Wasseraktivität a_w (**Gleichung (2.26)**) herangezogen als die Konzentration ausdrückende Größe, fallen alle Schmelzkurven zu einer einzigen zusammen, wie in **Abbildung 2.9b** gezeigt ist (Koop et al., 2000). Die Art der gelösten Substanz beeinflusst zwar den Wert der Wasseraktivität der Lösung, aber zu einer gegebenen Wasseraktivität existiert nur eine einzige Schmelztemperatur. Dadurch wird eine von der Substanz unabhängige Formulierung erhalten.

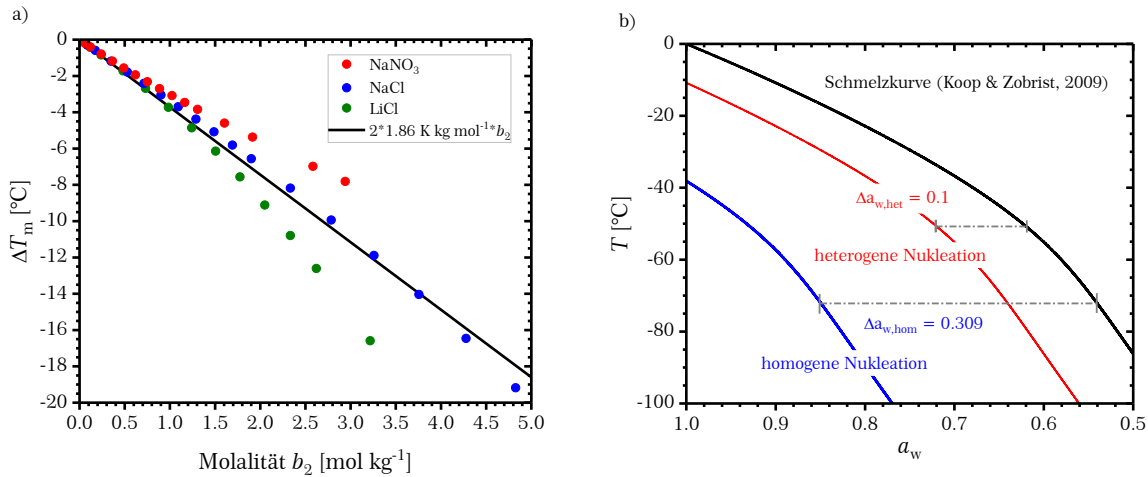


Abbildung 2.9: Schmelzpunktkurven in unterschiedlichen Darstellungen. a) Veranschaulichung der Schmelzpunkte für verschiedene wässrige Lösungen am Beispiel von zweifach dissoziierenden Salzen (Punkte) in Abhängigkeit von der Molalität (Lide, 2005) und vorhergesagt über Gleichung (2.24) (schwarze Linie). Für höhere Molalitäten ab etwa 1 mol kg⁻¹ sind unterschiedlich stark ausgeprägte Abweichungen von dem linearen Verlauf erkennbar. b) Auftragung der Schmelzpunkte als Funktion der Wasseraktivität ergibt eine einzige Kurve (schwarz; Koop and Zobrist, 2009), die durch einfachen horizontalen Versatz Δa_w ebenso die heterogene Nukleation (rot), hier dargestellt durch einen Eiskeim mit einer heterogenen Nukleationstemperatur in reinem Wasser bei -10.8 °C, und homogene Nukleation (blau) mit $T_{\text{hom,Wasser}} = -38$ °C beschreiben kann.

Die Wasseraktivität einer wässrigen Lösung ist definiert über das Verhältnis von Dampfdruck der Lösung p_{Lsg} zu dem Dampfdruck von reinem Wasser $p_{\text{H}_2\text{O}}^0$ bei derselben Temperatur. Am flüssig-fest-Phasenübergang, also bei der Temperatur T_m , entspricht der Dampfdruck der flüssigen Phase dem Dampfdruck von Eis p_{Eis} .

$$a_w(T) = \frac{p_{\text{Lsg}}(T)}{p_{\text{H}_2\text{O}}^0(T)} = \frac{p_{\text{Eis}}(T)}{p_{\text{H}_2\text{O}}^0(T)} = [p_{\text{Eis}}(T)] \cdot [p_{\text{H}_2\text{O}}^0(T)]^{-1} \quad (2.26)$$

Eine Überarbeitung der Beschreibung der Schmelzpunktkurve mit der Temperatur in K von Koop et al. (2000) findet sich in Koop and Zobrist (2009) und ist in **Gleichung (2.27)** wiedergegeben.

$$a_{w,\text{Eis}}(T_m) = \left[\exp \left(9.550426 - \frac{5723.265}{T_m} + 3.53068 \cdot \ln(T_m) - 0.00728332 \cdot T_m \right) \right] \cdot \left[\exp \left(54.842763 - \frac{6763.22}{T_m} - 4.210 \cdot \ln(T) + 0.000367 \cdot T_m + \tanh(0.0415 \cdot (T_m - 218.8)) \right) \right] \cdot \left(53.878 - \frac{1331.22}{T_m} - 9.44523 \cdot \ln(T) + 0.014025 \cdot T_m \right)^{-1} \quad (2.27)$$

In **Abbildung 2.9b** ist außerdem angedeutet, dass auch die heterogenen und homogenen Nukleationstemperaturen keine Abhängigkeit von den chemischen Eigenschaften der Lösungen haben und ebenso auf eine Linie fallen, welche durch eine einfache

horizontale Verschiebung der Schmelzpunktkurve zu höheren Aktivitäten erhalten wird. Für eine homogene Nukleationstemperatur von -38 °C bzw. 235 K in Mikrometertröpfchen wird die Kurve um den Betrag $\Delta a_w = 0.309$ zu höheren Aktivitäten verschoben, um die homogenen Nukleationstemperaturen einer beliebigen wässrigen Lösung vorhersagen zu können. Als erster Richtwert kann für die homogene Nukleationstemperatur einer Lösung $\Delta T_{\text{hom}} = 1.5 \cdot \Delta T_m$ herangezogen werden (Koop and Zobrist, 2009). Dabei werden allerdings weder die Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität noch die Nichtlinearität des Zusammenhangs zwischen ΔT_{hom} und ΔT_m für verschiedene Konzentrationen berücksichtigt. Auch die heterogene Nukleationskurve kann aus Kenntnis der Eisnukleationstemperatur eines Eiskeims in reinem Wasser bestimmt werden (Zobrist et al., 2008b). Dabei existiert für jeden heterogenen Eiskeim ein spezifischer Δa_w -Wert.

2.1.4.1 Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität

Außerdem lassen sich die Wasseraktivitäten der Lösungen aus den bekannten Werten für T_{hom} , T_{het} oder T_m oder im umgekehrten Fall aus der Wasseraktivität die Phasenübergangstemperaturen bzw. -kurven ermitteln. Dabei erschweren die Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität sowie die Schwierigkeit der Messungen von a_w im unterkühlten Temperaturbereich die Berechnungen.

Im einfachsten Fall kann die Temperaturabhängigkeit als vernachlässigbar angesehen werden, sodass die Werte für a_w bei niedrigeren Temperaturen entweder über den Schmelzpunkt oder durch Wasseraktivitätsmessungen bei experimentell zugänglichen Temperaturen oberhalb von T_m erhalten werden. Allerdings zeigen zahlreiche Lösungen eine zum Teil stark ausgeprägte Temperaturabhängigkeit, wie die Beispiele in (Koop, 2004; Koop and Zobrist, 2009) von PEG300- und NH_4NO_3 -Lösungen beweisen, deren Wasseraktivitäten sich mit sinkender Temperatur sogar in entgegengesetzte Richtung verändern.

Eine Modifikation stellen dabei Modellierungen oder Messungen von a_w bei verschiedenen Temperaturen in Abhängigkeit des Massenbruchs w_2 und eine anschließende Anpassung der erhaltenen Datenpunkte mit der dreidimensionalen **Funktion (2.28)**, unter möglicher Einbeziehung des a_w -Wertes bei der gemessenen Schmelztemperatur dar (Zobrist et al., 2008a). Mittels der daraus erhaltenen Parameter a - g lassen sich für beliebige Temperaturen T die Wasseraktivitäten a_w berechnen. Eine vorherige Bestimmung der Parameter a , b und c über die Massenbruch-Abhängigkeit der Wasseraktivität bei der Standardtemperatur $T^\ominus = 298.15\text{ K}$ (**Gleichung (2.29)**) kann dabei die dreidimensionale Anpassung erleichtern.

$$a_w(w_2, T) = \frac{1 + a \cdot w_2}{1 + b \cdot w_2 + c \cdot w_2^2} + (T - T^\ominus) \cdot (d \cdot w_2 + e \cdot w_2^2 + f \cdot w_2^3 + g \cdot w_2^4) \quad (2.28)$$

$$a_W(w_2, T^\theta) = \frac{1 + a \cdot w_2}{1 + b \cdot w_2 + c \cdot w_2^2} \quad (2.29)$$

Allerdings ist auch die in **Gleichung (2.28)** berücksichtigte Annahme einer linearen Temperaturabhängigkeit im extrapolierten Temperaturbereich mit einer Ungenauigkeit behaftet, wie auch hier das Beispiel PEG300 zeigt, in dessen wässrigen Lösungen a_W besonders bei hohen Konzentrationen nicht-linear mit abnehmender Temperatur sinkt.

Eine dritte Methode, eine temperaturabhängige Beschreibung der Wasseraktivität zu generieren, ist eine lineare Interpolation zwischen den aus den T_m - und T_{hom} -Kurven erhaltenen Wasseraktivitäten einer Lösung mit einem bekannten Massenbruch (Zobrist et al., 2008a; Koop and Zobrist, 2009).

Diese wasseraktivitätsbasierte Eisnukleationstheorie ist für die Beschreibung von Klimamodellen oder Modellierungen der Nukleationsratenkoeffizienten von Nutzen (Koop et al., 2000; Koop, 2004). Besonders in der Atmosphärenchemie ist die Möglichkeit der Betrachtung der Nukleationstemperaturen als Funktion der Wasseraktivität sehr hilfreich, da diese im Gleichgewicht der Lösung mit dem Wasserdampf der Umgebung ($p_{\text{Lsg}}(T) = p_{\text{H}_2\text{O}}(T)$) der in diesem Teilbereich der Chemie genutzten Größe relative Luftfeuchtigkeit (engl. **relative humidity**; RH), entspricht.

$$a_W = RH = \frac{p_{\text{H}_2\text{O}}}{p_{\text{H}_2\text{O}}^0} \quad (2.30)$$

2.2. Experimentelle Methoden zur Untersuchung der heterogenen Eisnukleation

Um das Gefrieren wässriger Proben und den Einfluss von potentiellen heterogenen Eiskeimen in Abhängigkeit der Temperatur zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene auf dem Abkühlen von wässrigen Tröpfchen basierende experimentelle Methoden angewandt. Dazu wurde neben der optischen Erfassung des Gefrierprozesses mittels des in der Arbeitsgruppe entwickelten **BINARY** (Budke, C. and Koop, T., 2015), s. dazu **Abschnitt 2.2.1**, ein kalorimetrisches Messinstrument (**DSC**), das die entstehenden Wärmeströme bei Phasenzustandsänderungen detektieren kann und in **Kapitel 2.2.2** detailliert beschrieben wird, eingesetzt. Außerdem wurde für die Analyse eines Eiskeimes die **Mikrofluidik** (Eickhoff, 2017) als eine weitere auf visueller Detektion beruhende Messmethode verwendet (**Abschnitt 2.2.3**). Die folgenden **Kapitel 2.2.1 - 2.2.3** geben eine detaillierte Übersicht über die Funktionsprinzipien und die Messprozeduren der oben erwähnten Messgeräte.

2.2.1. BINARY (Bielefeld Ice Nucleation ARraY)

Zur optischen Detektion von Gefrierprozessen in wässrigen Tropfen im Millimeter- bzw. Mikroliter-Bereich wird in dieser Arbeit auf das in der Arbeitsgruppe aufgebaute **BINARY** (Budke, C. and Koop, T., 2015) zurückgegriffen. Der Name steht dabei als Apronym für **Bielefeld Ice Nucleation ARraY**, umschreibt also die Funktion des Messaufbaus zur Untersuchung von Eisnukleationseigenschaften. Desweiteren stellt der Name auch den Bestand zweier äquivalenter Aufbauten hervor, die intern zur besseren Unterscheidung als 'Tom' und 'Jerry' benannt wurden.

Mit dem **BINARY** können lösliche Moleküle und suspendierte Partikel auf ihre heterogenen Eisnukleationseigenschaften im Immersionsmodus analysiert werden. Bei kontinuierlicher Verringerung der Temperatur der wässrigen Tropfen tritt bei dem Übergang in den festen Phasenzustand eine visuell erkennbare Änderung der Trübheit des Tropfens ein, wodurch die für das eisnukleierende Material spezifische Nukleationstemperatur ausgewertet werden kann.

2.2.1.1 Aufbau der Messzelle

Die Messkammer des **BINARY** (s. **Abbildung 2.10**) besteht aus einer für diesen Zweck umgebauten, kommerziell erworbenen Kühleinheit (**Linkam LTS 120**), die mit einem Peltierelement mit den Maßen $40 \times 40 \text{ mm}^2$ als Temperierplattform ausgerüstet ist. Die Temperatur des Peltierelements kann mit einer Genauigkeit von $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ erfasst werden (Linkam Scientific, 2018b). Durch ein angeschlossenes auf $+3$ bis $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ gehaltenes Thermostat (**VWR MX**) zum permanenten Kühlen der warmen Seite können Temperaturen auf der zugänglichen kalten Seite des Peltierelements von $+15 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu $-40 \text{ }^\circ\text{C}$ erreicht werden. Auf diese Fläche wird eine hydrophobisierte, $140 \text{ }\mu\text{m}$ dünne

Glasscheibe (Paul Marienfeld GmbH & Co KG) mit den gleichen Maßen sowie ein selbst angefertigtes PDMS-Gitter (PDMS: PolyDiMethylSiloxan; Präparation: Dreischmeier, 2013) mit einem 6x6- oder 8x8-Lochmuster platziert, sodass bis zu 36 bzw. 64 Tropfen in einer Messung beobachtet werden können. Diese Vorrichtung soll voneinander unabhängige Nukleationsereignisse ermöglichen und den Wegener-Bergeron-Findeisen-Prozess verhindern. Eine gute Wärmeleitung zwischen Peltierelement und der Glasscheibe wird durch das Andrücken einer Plexiglas®-Abdeckung auf dem PDMS-Gitter mit einem mit Schrauben fixierten Aluminiumring gewährleistet.

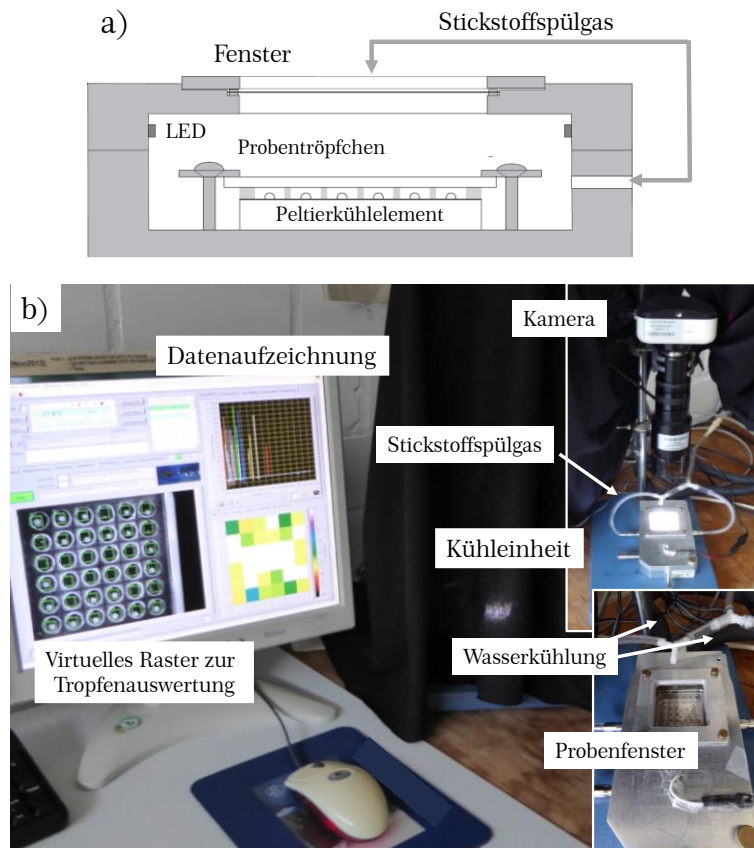


Abbildung 2.10: a) Schematische Darstellung der BINARY-Messzelle in Seitenansicht mit auf dem Peltierelement aufliegender hydrophober Glasscheibe mit aufgetragenen Tropfen, die durch das Abdeckfenster von oben betrachtet werden können. Spülen der Zelle mit trockenem Stickstoffgas-Strom verhindert Kondensieren von Luftfeuchtigkeit während des Abkühlens. Die LED-Lampen im Inneren der Messkammer erhöhen die Helligkeit zur besseren Detektion. Abbildung mit Überarbeitung entnommen aus Budke und Koop (2015). b) Foto der BINARY-Messapparatur ('Tom') mit angeschlossenen Computer zur simultanen Datenerfassung. Die vergrößerten Bilder zeigen die Messzelle mit Kamera sowie den Schläuchen zur Stickstoffgasspülung und Wasserkühlung.

Um eine Beleuchtung und somit bessere Detektion der Tropfen zu erreichen, wird der Innenraum der Kammer mit einer LED-Leiste (LED: Light Emitting Diode) angestrahlt. Trockenes Stickstoffspülgas wendet ein Kondensieren von Luftfeuchtigkeit sowohl innerhalb der Messzelle als auch auf dem äußeren Deckglas ab. In den einzelnen Probenkammern innerhalb des PDMS-Gitters können Tropfen

mit einem Volumen von 10 μl bis herunter zu 0.1 μl aufgetragen werden. Diese Grenzen ergeben sich einerseits durch erschwertes Pipettieren bei kleineren Volumina bzw. für größere Tropfen durch die eingeschränkten Ausmaße der Messkammern von 5 mm (6x6) oder 4 mm (8x8) Durchmesser und 2 mm Höhe. Desweiteren wird das gesamte Kühlelement mit einem schwarzen Tuch abgedeckt, um Einflüsse vom Umgebungslicht auf die optische Detektion zu vermindern. Die Temperatur der Kühleinheit wird über ein in der Arbeitsgruppe von C. Budke eingerichtetes, auf der kostenlos verfügbaren Software LabVIEW™ 2010 (National Instruments, 2010) basierendes Programm (aktuell: Nuk_2017_Nov_Tom/Nuk_2017_Nov_Jerry) per Computer kontrolliert. Die optische Erfassung des Gefrierens und Schmelzens der Tropfen in den Probenkammern erfolgt über eine vertikal auf die Probenkammer gerichtete CCD-Kamera (QImaging MiroPublisher 5.0 RTV), die ebenfalls durch LabView™ gesteuert wird, wodurch in vorgegebenen Zeitabständen digitale Bilder generiert und zeitgleich automatisch gespeichert werden.

2.2.1.2 Auswertung mit LabView™

Die Analyse der Gefrierprozesse erfolgt mit einer LabView™-gestützten Plattform über die Erfassung der Grauwerte mit der Kamera in Abhängigkeit von der Temperatur (s. **Abbildung 2.11**; schwarze Kurve). Dabei wird über ein virtuelles 6x6- bzw. 8x8-Gitter jede Tropfenkammer ausgewählt und somit jeder einzelne Tropfen separat ausgewertet. Die Kamera kann zwischen 255 Graustufen unterscheiden, wobei 0 'schwarz' und 255 'weiß' entspricht. Diese Grauwerte werden simultan in Grauwertdifferenzen zwischen zwei aufeinander folgenden Datenpunkten umgerechnet, was graphisch dargestellt eine Messkurve mit signifikanten Signalen im positiven Grauwertdifferenzbereich beim Gefrierprozess bzw. bei negativen Grauwertdifferenzen beim Schmelzen ergibt (s. **Abbildung 2.11**; blaue Kurve). Besonders das Gefriersignal äußert sich in einer sehr intensiven Grauwertdifferenz, da der transparente flüssige Tropfen sich instantan in einen stark streuenden, opaken Eiskristall umwandelt, wie die in **Abbildung 2.12** dargelegten und zu der Datenkurve in **Abbildung 2.11** gehörenden Tropfenbilder in der Grauwertdifferenzkurve zeigen. Zwischen dem noch flüssigen Tropfen und dem vollständig durchgefrorenen Tropfen liegen lediglich 6 Sekunden, während der Schmelzvorgang mehrere Minuten umfasst.

Der sich während des Abkühlens um den großen Tropfen herum bildende Tröpfchenkranz resultiert aus Temperaturdifferenzen zwischen dem Objektträger und dem Tropfen, wodurch Wasser von wärmeren Bereichen des Tropfens auf die kältere Platte kondensiert. Dieser Tröpfchenkranz schmilzt bei der Schmelztemperatur von Wasser (hier: -0.5 °C), während der große Tropfen wegen des langsameren Wärmetransfers und dem daraus entstehenden Temperaturgradienten innerhalb des Tropfens erst bei höheren Temperaturen vollständig geschmolzen ist (hier: $+1\text{ °C}$). Die in **Abbildung 2.12** gezeigte Datenkurve stellt die Rohdaten, also nicht kalibrierten Daten dar.

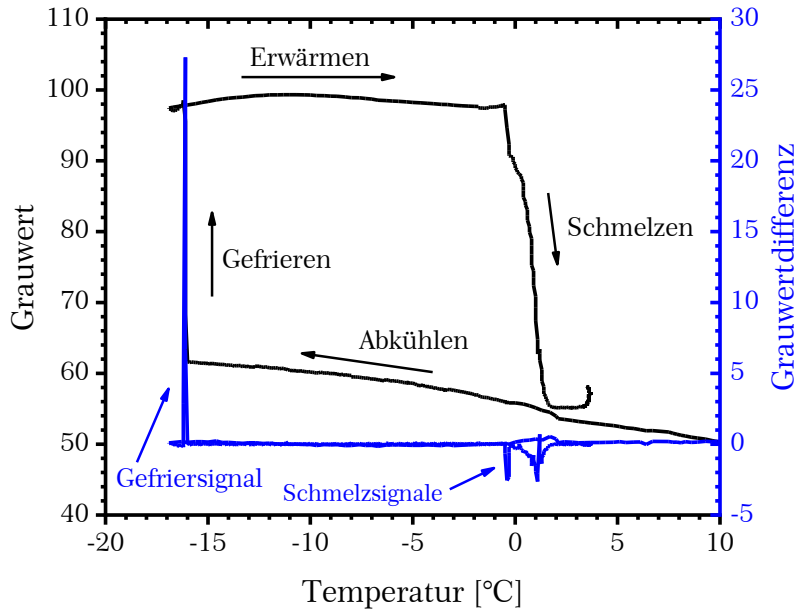


Abbildung 2.11: Darstellung des bei einer BINARY-Nukleationsmessung von Birkenpollen-Waschwasser bestimmten Grauwertes eines beispielhaften Tropfens (linke y-Achse, schwarze Kurve) sowie der Grauwertdifferenz zwischen zwei aufeinander folgenden Datenpunkten (rechte y-Achse, blaue Kurve) bei Änderung der Temperatur.

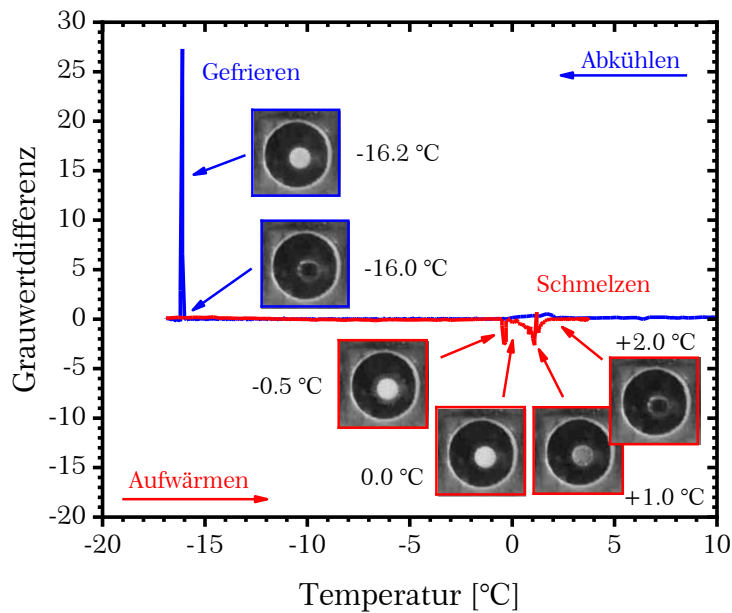


Abbildung 2.12: Abkühlkurve (blau) und Heizkurve (rot) am Beispiel eines Birkenpollen-Waschwasser enthaltenen Wassertropfens im BINARY-Experiment. Die für den Abkühlprozess präsentierten Bilder für den ausgewählten Tropfen bei den Temperaturen -16.0 °C und -16.2 °C zeigen die abrupte Änderung der Helligkeit des Tropfens während des heterogenen Nukleationsereignisses an, das sich in einem starken Anstieg der Grauwertdifferenz äußert. Die zwei negativen Signale in der Heizkurve resultieren aus dem Schmelzen des Tröpfchenkranzes bei -0.5 °C sowie des gesamten Tropfens bei $+1\text{ °C}$. Die Phasenübergänge wurden mit einer Abkühl- bzw. Aufheizrate von 1 °C min^{-1} erfasst. Die Temperaturen sind hier nicht kalibriert.

Überschreiten die vom Programm errechneten Grauwertdifferenzen in einer Tropfenkammer, die über ein virtuelles Raster erfasst wird, einen voreingestellten Grenzwert, der für das Gefrieren in der Regel +1 oder +2 und für das Schmelzen -1 beträgt, werden die zugehörigen Temperaturen als Gefrier- bzw. Schmelztemperatur simultan in einer Datentabelle ausgegeben.

2.2.1.3 Probenvorbereitung und Messeinstellungen

Als Objektträger für die BINARY-Messungen wurden hydrophobe Glasscheiben verwendet, da somit eine durch die Glasoberfläche ausgelöste heterogene Nukleation zurückgedrängt wird und somit der zugängliche Temperaturbereich für die Untersuchung heterogener Eiskeime erweitert wird. In Abhängigkeit der verwendeten Beschichtungen und Tröpfchengrößen kann die durch etwaige Verunreinigungen oder die Glasoberfläche ausgelöste heterogene Nukleation bis zu $T_{50} = -29 \pm 1 \text{ °C}$ unterdrückt werden (s. **Abbildung A.1**).

Für die älteren, zum Teil aus der Phase der Masterarbeit (Dreischmeier, 2013) stammenden Messungen wurden in der Arbeitsgruppe selbst präparierte, silanisierte Glasscheiben eingesetzt (Präparation: Budke, 2005). Diese Glasscheiben wurden mehrmals wiederverwendet. Dazu wurden sie nach jeder Messung zunächst mit Wasser abgespült und dann in einem Ethanol enthaltenen Becherglas und daran anschließend in Chloroform für etwa 30 s im Ultraschallbad gereinigt.

Bei Aufnahme einer Verdünnungsreihe einer Birkenpollenprobe war auffällig, dass sich trotz weiterer Verdünnung die Nukleationstemperaturkurve nicht mehr änderte (Dreischmeier, 2013), was die Vermutung nahelegte, dass die oben beschriebene Reinigung der Glasscheiben nicht den erhofften Effekt hatte. Von zahlreichen alternativen Reinigungsmethoden wie die Verwendung anderer Lösungsmittel zum Spülen wie *iso*-Propanol, Aceton oder Ethylacetat oder das für Küvettenreinigung üblicherweise verwendete Hellmanex® (Hellma Analytics), das letztendlich die hydrophobe Beschichtung zerstörte, längeres Spülen mit mehreren Lösungsmitteln hintereinander über jeweils 30 min oder Aufheizen der Glasplatte im Heizofen für eine Stunde bei über 100 °C war lediglich letztere Methode erfolgreich. Eine anschließende Messung mit reinem Wasser auf der auf diese Weise gereinigten Glasscheibe zeigte keinen von den Pollen beeinflussten Messhintergrund mehr. Um für jede gesäuberte Glasscheibe den Messhintergrund zu kennen, der zudem nicht immer reproduzierbar ist, müsste jede Glasscheibe vor der eigentlichen Probenmessung mit Wasser vermessen werden. Da der damit verbundene Aufwand nicht mit der Messzeit von maximal einer Stunde in Relation steht, wurde auf kommerziell erhältliche silikonisierte Glasscheiben (Paul Mariefeld GmbH & Co KG) umgestiegen. Diese wurden dann nur für eine Messung verwendet. Um die Überreste der Beschichtungsprozedur von den Glasscheiben zu entfernen, wurden sie vor einer Messung zunächst mit einem mit techn. Aceton getränkten Tuch abgerieben und anschließend in einem Becherglas mit Aceton p.a. wenige Sekunden in einem

Ultraschallbad behandelt. Mithilfe einer Pinzette wurde die Glasscheibe langsam senkrecht herausgezogen, um mögliche anhaftende Staubpartikel abfließen zu lassen. Bevor der gereinigte Objektträger nun auf das Peltierelement in der Linkam-Kühleinheit gelegt und mit dem PDMS-Gitter versehen wurde, wurde die am effektivsten beschichtete Seite über die Spiegelung eines Muster auf der im Labor befindlichen Deckenlampe überprüft. Erschien das Muster verschwommen, war eine gute Beschichtung und damit eine hydrophobe Eigenschaft anzunehmen, sodass diese Seite als Unterlage für die aufzutragenden Tropfen verwendet wurde (Jantsch, 2014).

Für alle BINARY-Messungen wurde am Tag der Messung frisch bidestilliertes VE-Wasser (Destille: **Westdeutsche Quarzschmelze; Geesthacht**) eingesetzt, da dieses besonders rein, d.h. frei von Staubpartikeln als auch biologischem Material und Fremdpartikeln ist, welche als potentielle heterogene Eiskeime die Untersuchungen der Proben auf Eisnukleationsaktivität überlagern würden. Vermessene ältere Proben waren zuvor im Gefrierschrank gelagert worden, um einen Alterungsprozess zu minimieren, für deren Verdünnungsreihen ebenso frisches bidestilliertes Wasser genutzt wurde. Um die Staubfreiheit zu unterstützen, wurde das Glasgefäß, in dem das bidestillierte Wasser gesammelt wurde, vorher mehrmals mit selbigem gespült.

Bidestilliertes Wasser weist eine deutlich höhere Reinheit als etwa VE- oder **MilliQ®**-Wasser (Merck KGaA, 2018) auf, deren niedrige Partikelkonzentration auf einer Reinigungssäule und einem Ionenaustauscherharz beruhen, aus denen wiederum Partikel in das Wasser gelangen können. Für die heterogene Eisnukleation ist ein einzelnes als Eiskeim fungierendes Partikel ausreichend, um die gesamte Probe zum Gefrieren zu bringen, weshalb VE- oder MilliQ®-Wasser für derartige Experimente nicht empfehlenswert sind.

Tropfenpräparation

Um während des Auftragens der Tropfen ein Kondensieren von Luftfeuchtigkeit sowie ein teilweises Verdampfen der schon aufgetragenen Tropfen zu minimieren, wurde die Temperatur des Peltierelements auf +15 °C gehalten und die Messkammer mit Stickstoffstrom überspült. Die Tropfen wurden mit einem Probenvolumen von 1 μl (Birkenpollen) oder 0.6 μl (**M. alpina**) auf die hydrophobe Glasplatte in die 36 (Birkenpollen) bzw. 64 (**M. alpina**) Kammern des aufliegenden PDMS-Gitters pipettiert. Im Fall der Birkenpollenmessreihe wurde eine manuell zu bedienende **Eppendorf®**-Pipette verwendet, für die Messungen der **M. alpina**-Proben eine automatisierte Transferpipette (**Transferpette®; BRAND**), die eine einmalige Aufnahme von bis zu 10 μl ermöglicht und dieses Volumen in kleineren Schritten wieder auszugeben vermag. Somit konnten hintereinander 16 Tropfen mit einem Volumen von 0.6 μl aufgetragen werden, was die Gesamtzeit der Messvorbereitung stark reduzierte und somit auch ein Kondensieren oder Verdampfen von Wasser oder ein eventuelles Sedimentieren von suspendierten Partikeln vermindert. Bei den

Birkenpollen-Suspensionen wurde das Vorratsgefäß nach 6 aufgetragenen Tropfen leicht geschüttelt, um der Sedimentation der Pollen entgegen zu wirken und eine gleichmäßige Durchmischung zu gewährleisten.

Bei den letzten Messungen mit *M. alpina*-Proben wurden während der gesamten Vorbereitung einschließlich der Glasscheibenreinigung und Tropfenaufbringung Einmalhandschuhe verwendet sowie darauf geachtet, flusenfreie Kleidung zu tragen, um eine Kontamination mit Hautschüppchen oder Flusen, die als heterogene Eiskeime wirken könnten, möglichst gering zu halten. Nach Verschließen der Messkammer wurde der Stickstoffgas-Strom eingeschaltet, um während der Kühlphase Störungen durch kondensierte Luftfeuchtigkeit innerhalb der Zelle oder auf dem äußeren Deckglas zu vermeiden. Nach einer Messung wurde die Glasscheibe entsorgt und das PDMS-Gitter mit Wasser gespült, um eventuell anhaftende Lösungsrückstände zu entfernen.

Messprozedur

Die Messungen wurden mit einer Kühlrate von -1 °C min^{-1} durchgeführt, das Aufwärmen der Tropfen erfolgte mit einer höheren Rate von in der Regel $+5\text{ °C min}^{-1}$. Bei ausgewählten Messungen wurde, um die Schmelztemperaturen genauer zu erfassen, zwischen -2 °C und $+3\text{ °C}$ mit einer Rate von $+1\text{ °C min}^{-1}$ aufgeheizt. Dabei wurden im Kühlmodus im Temperaturbereich unterhalb von 0 °C und im Heizmodus im oben genannten Bereich alle sechs Sekunden bzw. 0.1 °C ein Bild gespeichert und drei Datenpunkte aufgenommen (s. auch **Tabelle 2.1**). Im weiteren, weniger interessanten Temperaturbereich erfolgt die Bildspeicherung lediglich alle 12 Sekunden. Bei Untersuchungen mit aktiven heterogenen Eiskeimen wurde vom Kühl- in den Heizmodus gewechselt, sobald alle Tropfen gefroren waren, um die Messzeit zu verkürzen. Bei den übrigen Messungen wurde bis zur Minimaltemperatur von etwa -36 °C bis -38 °C abgekühlt, um gewährleisten zu können, dass alle Tropfen gefroren waren.

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Temperaturrampen bei den BINARY-Messungen sowie die Anzahl an gespeicherten Datenpunkten bzw. Bildern. Die jeweilige Endtemperatur wird mit der dazu gehörenden Rate erreicht.

Endtemperatur [°C]	Rate [°C min ⁻¹]	Datenpunkte [min ⁻¹]	Bilder [min ⁻¹]
+15	--		
+3	5	5	5
min. -38 °C	1	30	10
-2	5	5	5
3	1 (5)	30 (5)	10
6	--		

2.2.1.4 Temperaturkalibration

Die von der Linkam-Kühleinheit ausgegebene Temperatur entspricht nicht der tatsächlichen Temperatur im Probenröpfchen. Dieser Umstand folgt vor allem aus der verzögerten Wärmeleitung zwischen dem Peltierelement und dem Probenröpfchen. Daher wurde eine Kalibration bezüglich der Temperatur durchgeführt (Budke, C. and Koop, T., 2015), mit der sich die reale Temperatur T_{kal} in K aus der im Experiment erhaltenen Temperatur T_{exp} in K in Abhängigkeit von der Rate β in $K \text{ min}^{-1}$ berechnen lässt (**Gleichung (2.31)**) und Parameter in **Tabelle 2.2**). Die Rate kann ein positives oder negatives Vorzeichen haben entsprechend dem Heiz- oder Kühlprozess.

$$T_{kal} = -[a + b \cdot (273.15 + T_{exp})] - \left[\begin{array}{l} c + d \cdot (273.15 + T_{exp}) \\ + e \cdot (273.15 + T_{exp})^2 \end{array} \right] \cdot \beta + T_{exp} \quad (2.31)$$

Tabelle 2.2: Parameter für die **Funktion (2.31)** zur Kalibration der Temperaturen der BINARY - Messeinheiten 'Tom' und 'Jerry' (Budke, C. and Koop, T., 2015).

	a [min]	b [min K ⁻¹]	c [min]	d [min K ⁻¹]	e [min K ⁻¹]
'Tom'	-6.03165	0.02113	3.59774	-0.02956	$6.10156 \cdot 10^{-5}$
'Jerry'	-5.2657	0.01777	5.14943	-0.04034	$7.94923 \cdot 10^{-5}$

Zur Temperaturkalibration wurden fünf Phasenübergangstemperaturen im Bereich zwischen -37 °C bis 0 °C von drei verschiedenen Substanzen herangezogen. Neben den flüssig-fest-Phasenübergängen von Wasser (0 °C) und Tridecan (-5.41 °C) sowie Undecan (-25.61 °C) wurden auch die fest-fest-Phasenumwandlungen der beiden Alkane erfasst (Tridecan: -18.15 °C ; Undecan: -36.85 °C). Da es beim Abkühlen zu einer starken Unterkühlung kommen kann, die Überheizung aber in der Regel vernachlässigbar klein ausfällt, erfolgte die Kalibration lediglich im Heizmodus. Dieses kann jedoch ein kritischer Punkt sein kann, da die Nukleationsmessungen im Abkühlmodus erfolgen. Um die Ratenabhängigkeit der Nukleation untersuchen zu können, wurde diese Kalibration bei sechs verschiedenen Heizraten zwischen $+0.1 \text{ °C min}^{-1}$ und $+10 \text{ °C min}^{-1}$ durchgeführt ($0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 \text{ °C min}^{-1}$). Die Genauigkeit der kalibrierten Temperatur beträgt $\pm 0.3 \text{ °C}$.

2.2.2. Dynamische Wärmestromdifferenzkalorimetrie (DSC)

Mittels der Dynamischen Wärmestromdifferenzkalorimetrie, die im englischen Sprachgebrauch als **Differential Scanning Calorimetry**, kurz **DSC**, bezeichnet wird und im Folgenden stets mit dieser Abkürzung erwähnt wird, können Phasenumwandlungen in Systemen detektiert werden. Bei Phasenumwandlungen erster Ordnung wie Gefrieren von Wasser ändert sich die Enthalpie des Systems sprunghaft, gleichbedeutend mit einer Freisetzung der Kristallisationsenthalpie, die vom Kalorimeter erfasst wird (Atkins and Paula, 2006). Damit lassen sich heterogene Eiskeime enthaltene Probenröpfchen in inversen Emulsionen auf ihre Eisnukleationstemperatur untersuchen. In den folgenden Abschnitten wird auf die Funktionsweise eines Wärmestromkalorimeters eingegangen sowie der Vorteil der Präparation von inversen Emulsionen herausgestellt.

2.2.2.1 Prinzip der Wärmestromkalorimetrie

Wie die Bezeichnung der Messmethode vermuten lässt, wird bei der dynamischen Wärmestromdifferenzkalorimetrie der Unterschied zwischen den Wärmeströmen in einer Probe und einer Referenz bei kontinuierlicher Temperaturänderung gemessen. Die Probe und Referenz werden in kleinen Aluminiumtiegel hermetisch verschlossen und auf einer Konstantan-Plattform platziert, in die Chromel-Thermosensoren zur Erfassung der Temperatur integriert sind (TA Instruments, 2018) (s. **Abbildung 2.13**). Ein dritter Thermosensor zwischen den beiden Probenröpfchern soll unabhängig davon die Temperatur der Messzelle erfassen. Die Plattform wird von einem als Heizsystem dienenden Silberblock eingefasst und ist zudem an den die Kühlstäbe enthaltenden Kühlring gekoppelt. Dieser wird über ein angeschlossenes **LNCS** (**LNCS: Liquid Nitrogen Cooling System**) mit flüssigem Stickstoff gespeist, sodass die minimal erreichbare Temperatur -180 °C beträgt, wodurch ein großer Spielraum für Nukleationsexperimente in wässrigen Lösungen besteht.

Das verwendete **DSC Q100** von **TA Instruments** besitzt eine Temperaturgenauigkeit von 0.1 °C und hat eine hohe Wärmestrommessempfindlichkeit von $0.2\text{ }\mu\text{W}$. Die Maximaltemperatur des Heizofens beträgt $+725\text{ °C}$ (TA Instruments, 2018). Trockenes, auf Zelltemperatur gebrachtes Stickstoffgas durchströmt die adiabatische Messzelle, um vorhandene Luftfeuchtigkeit heraus zu spülen. Die Plattform wird permanent auf der Temperatur von flüssigem Stickstoff gehalten, gegen die der Heizofen ansteuert, um die Temperatur zu variieren. Der Wärmestrom fließt nun während eines Messprozesses durch Probe und Referenz, deren Temperatur über die Thermosensoren erfasst wird. Sind Probe und Referenz gleich, ist die Wärmestromdifferenz gleich Null, sodass die Messkurve lediglich eine durch die Wärmekapazität bestimmte Basislinie ist. Verändert sich die Probe während der Temperaturänderung, indem etwa die zugeführte Wärme für einen Schmelzprozess aufgewendet werden muss, entsteht folglich eine Differenz in den durch die Probe

und Referenz fließenden Wärmeströmen, die über die Temperaturdifferenzen erfasst wird.

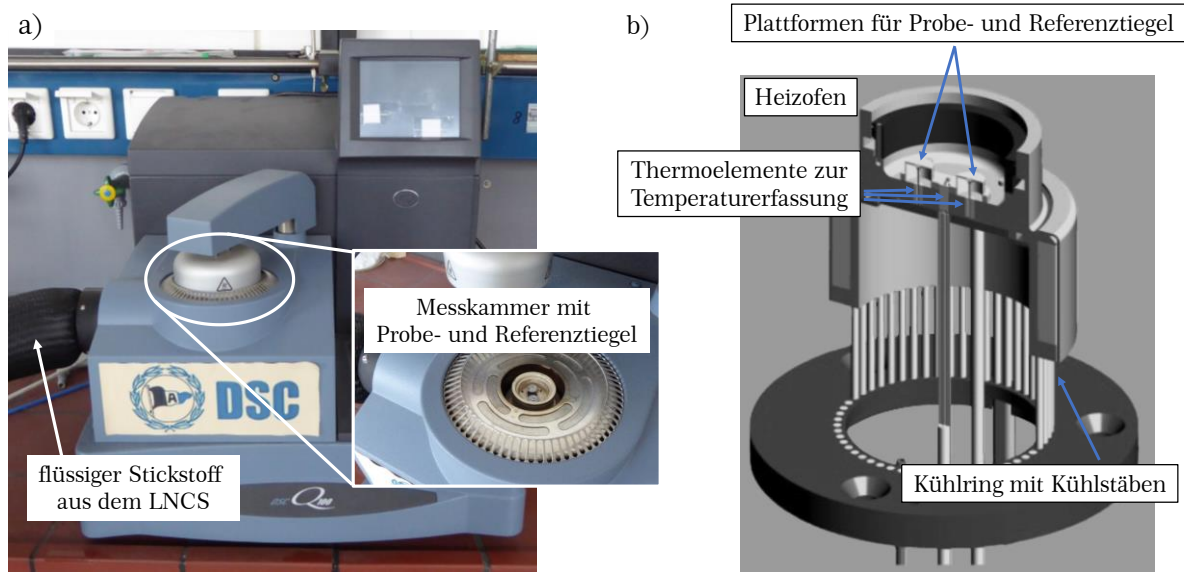


Abbildung 2.13: a) Foto des DSC-Messgerätes mit Vergrößerung der Messkammer, in die die Probe- und Referenztiegel platziert werden. Über den links im Bild zu sehenden Schlauch wird flüssiger Stickstoff aus dem angeschlossenen LNCS zugeführt. b) Darstellung der Messkammer eines Wärmestromkalorimeters mit Probe- und Referenzplattform sowie Heizring und Kühlstäben, durch die der flüssige Stickstoff geleitet wird. Abbildung aus der Informationsbroschüre von (TA Instruments, 2018) überarbeitet.

Für die Messungen in dieser Arbeit ist die zugeführte Wärme für den Schmelzprozess bzw. die freiwerdende Wärme für den Gefriervorgang von besonderem Interesse, die sich in deutlichen Wärmestromänderungen in der Messkurve, dem Thermogramm, zeigen (**Abschnitt 2.2.2.2**). Aufgrund der unterschiedlichen Wärmekapazitäten der flüssigen und festen Phase durch veränderte Anzahl an den Bewegungsfreiheitsgraden, besonders der Translation, ist die Basislinie im Thermogramm nach einem Phasenübergang relativ zu der vor der Umwandlung versetzt.

2.2.2.2 Inverse Emulsionen in DSC-Messungen

Prinzip der inversen Emulsionen

Die Untersuchung der Aktivität eines potentiellen Eisnukleators in einem Ensemble von kleinen wässrigen Proben tropfen ist vorteilhaft, da heterogene Nukleation durch in der Probe erhaltene Staubpartikel lediglich in einem sehr geringen Anteil der Tröpfchen ausgelöst wird (Koop, 2004). Aufgrund der geringen Tröpfchengröße im Mikrometerbereich (s. **Anhang A.6**) tritt die homogene Nukleation erst bei niedrigen Temperaturen um -38 °C ein, weshalb der für den zu untersuchenden heterogenen Eiskeim zugängliche Bereich im Vergleich mit BINARY-Messungen erheblich vergrößert wird.

In **Abbildung 2.14** wird der Vorteil solcher Emulsionsmessungen gegenüber einer bulk-Probe mit den entsprechenden Abkühlkurven aus den DSC-Thermogrammen veranschaulicht. Als Beispiel für eine bulk-Probe ist eine Messung mit einem $10\ \mu\text{l}$ großen Wassertropfen gezeigt (**Abbildung 2.14a**; blaue Kurve in **Abbildung 2.14c**), die beim Abkühlen mit einer Rate von $-30\ \text{°C min}^{-1}$ schon bei $-20\ \text{°C}$ gefriert, ausgelöst wahrscheinlich durch ein enthaltenes Staubpartikel, das durch die unsymmetrische Form in **Abbildung 2.14a** dargestellt ist. Weitere sich in der Probe befindende, weniger aktive Eiskeime können demnach nicht mehr detektiert werden. Durch das instantane Freisetzen der Kristallisationsenthalpie erwärmt sich die Probe so stark, dass die Temperatur kurzzeitig ansteigt, bevor sie durch die Kühlung wieder sinkt und die Messkurve auf die Basislinie zugeht. Die sich daraus ergebende Schleifenform ist typisch für bulk-Gefriersignale.

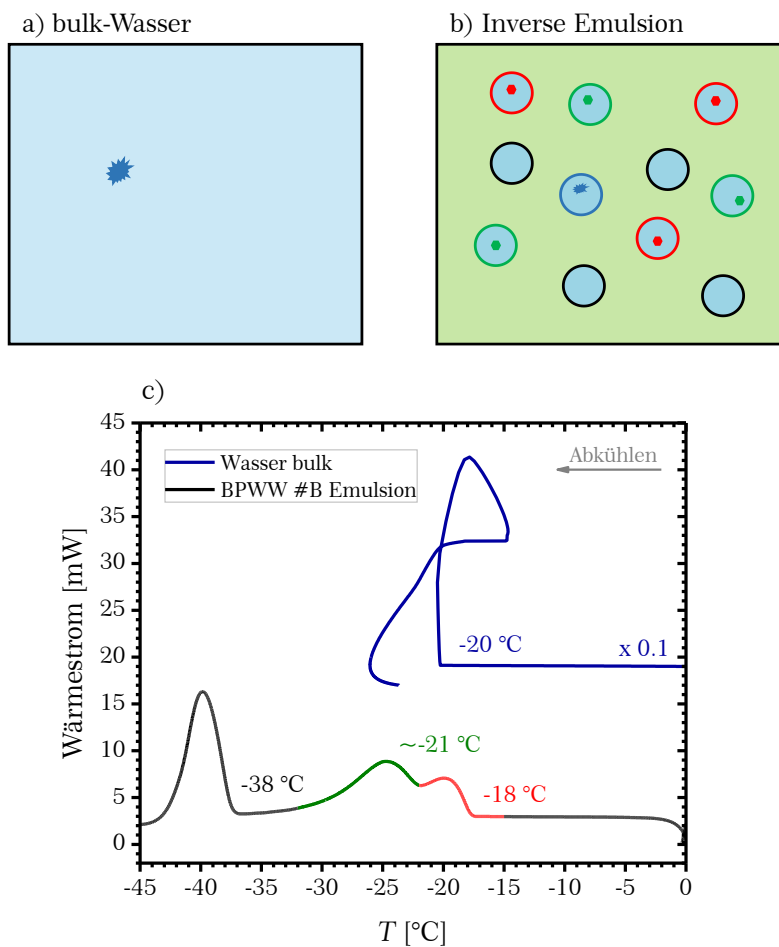


Abbildung 2.14: Darstellung der Vorteile einer Emulsionsmessung zur Untersuchung der heterogenen Eisnukleation. Die beiden obigen Bilder zeigen a) eine bulk-Probe mit Staubteilchen sowie b) eine inverse Emulsion mit vier Arten von Wassertröpfchen: wenige enthalten unerwünschte Staubteilchen (blau), die zwei zu untersuchenden Eiskeime aus den Birkenpollen besetzen eine wesentlich größere Anzahl an Tröpfchen (rot und grün), aber nicht alle (schwarz). c) DSC-Thermogramme einer bulk-Probe (blau) sowie einer Emulsion (schwarz-rot-grün). Während in der bulk-Probe ein vorhandenes Partikel die Nukleation des gesamten Tropfens auslöst, ergibt sich für die Emulsionsmessung eine Aufteilung der Nukleationsereignisse sowohl auf die heterogene Eisnukleation bei $-18\ \text{°C}$ bzw. $\sim -21\ \text{°C}$ als auch auf die homogene Nukleation bei $-38\ \text{°C}$.

Wird die Wasserprobe mit dem Staubpartikel und in diesem Beispiel mit Birkenpollenwaschwasser # A (BPWW) zu einer inversen (Wasser-in-Öl-)Emulsion verrührt (s.u.), enthält ein Tröpfchen das Staubpartikel und eine deutlich größere Anzahl an Tropfen entweder Eiskern (rote und grüne Sechsecke) oder keinen Eiskeim (**Abbildung 2.14b**). Das Gefrieren in dem Tröpfchen mit dem Staubteilchen kann aufgrund des geringen Wärmebeitrags nicht detektiert werden, während sowohl die durch die Birkenpollenmoleküle ausgelöste heterogene Nukleation bei der spezifischen Temperatur von -18 °C bzw. $\sim -21\text{ °C}$ (roter und grüner Bereich in unterem Thermogramm in **Abbildung 2.14c**) als auch die homogen nukleierenden Tropfen bei -38 °C (schwarzer Bereich) kalorimetrisch erfasst werden.

Da im Mittel nur ein Eiskeim in einem Tropfen enthalten ist, geben die Intensitäten der heterogenen Gefriersignale Auskunft über die relativen Konzentrationen mehrerer aktiver Eiskeime zueinander. So besteht ein direkter Zugang zu den Nukleationstemperaturen jedes einzelnen Keimtyps. In BINARY-Messungen dagegen wird immer nur der beste Eiskeim detektiert, weshalb gering konzentrierte, weniger aktive Keime mitunter verdeckt bleiben. Auch in DSC-Experimenten kann ein zu einem deutlich geringeren Anteil vorliegender Eiskeim durch das Signal eines anderen Keimes ähnlicher Aktivität überlagert werden.

Nachteilig ist bei DSC-Experimenten, dass die Emulsionen polydispers sind und dass mögliche Einflüsse des Eiskeims auf die Stabilität der Emulsion bzw. Wechselwirkungen mit dem Emulgator nicht ausgeschlossen werden können. Relativ große benötigte Volumina der wässrigen Phase von 1 oder 2 ml verlangen mitunter eine Verdünnung der zu untersuchenden Probe, was gleichbedeutend mit einer Konzentrationsverringerung der aktiven Eiskeime ist. Das dann durch eine sehr kleine Anzahl an Tropfen ausgelöste Gefriersignal kann im ungünstigsten Fall unter die Nachweisgrenze des DSC fallen.

Präparation der inversen Emulsionen

Als organische Phase für die inversen Emulsionen wurde eine Mischung aus Methylcyclohexan und Methylcyclopentan im Verhältnis 1:1 (v:v) verwendet, worin der Emulgator **Span65®** (Handelsname für Sorbitantristearat) zu einem Anteil von 7 Gew% gelöst vorlag. Da dessen Löslichkeit bei Raumtemperatur sehr gering ist, wurde der Emulgator vor jeder Emulsionspräparation unter leichtem Erwärmen und Rühren gelöst. Die wässrige Lösung wurde jeweils mit frischem bidestillierten Wasser angesetzt und zum Teil nach Lagerung im Kühl- oder Gefrierschrank erst zu einem späteren Zeitpunkt vermessen. In einigen Fällen wurde eine konzentrierte Probe erst vor der Messung mit frisch bidestilliertem Wasser verdünnt. Für die Herstellung der Emulsionen wurden gleiche Volumina (1 oder 2 ml) der wässrigen und der organischen Phase in ein Reagenzröhrchen (5 bzw. 10 ml) aus Polypropylen pipettiert und dieses Zweiphasensystem anschließend bei Raumtemperatur für 10 min bei

20 000 Umdrehungen pro Minute (UpM) mit einem Hochleistungsdispersiergerät gerührt (IKA Ultra-Turrax T25 basic).

Die dabei entstandene Emulsion enthielt Wassertröpfchen in der Ölmatrix im Bereich von etwa 1 - 10 μm mit einem Maximum der Verteilung bei $\sim 2 \mu\text{m}$ (Anhang A.6). Von dieser Emulsion wurden 10 μl , entsprechend etwa 7 mg, in einen Aluminium-Tiegel (TA Instruments) überführt, welcher für die darauf folgende Messung hermetisch abgeriegelt wurde. Die Emulsion begann schon innerhalb der ersten Minuten nach dem Entfernen des Dispersiergeräts sich wieder zu entmischen. Die Probe für die Messung wurde daher möglichst zeitnah entnommen und die Emulsionen immer frisch hergestellt. Der Probentiegel (Leergewicht $\sim 50 \text{ mg}$) wurde gegen einen mit Luft gefüllten Referenztiegel vermessen.

Messeinstellungen

In der Regel wurde für alle Emulsions-Nukleationsmessungen eine Kühlrate von $-5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ verwendet, damit einerseits die Messzeit möglichst gering gehalten wurde und andererseits vor allem die heterogenen Nukleationssignale bei höheren Raten nicht zu sehr verschmiert wurden. Zudem beeinflusst die Kühlrate die Nukleationstemperatur, sodass eine möglichst niedrige Rate zu einem besseren Vergleich mit z. B. den BINARY-Messungen mit einer Rate von $-1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ angewendet wurde. Aufgewärmt wurde im Bereich der entsprechenden Schmelzsignale mit $+1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, wodurch der Schmelzpunkt mit einer höheren Temperaturgenauigkeit ermittelt werden konnte (s. auch Tabelle 2.3). Trotz erfolgter ratenabhängiger Temperaturkalibration (s. Abschnitt 2.2.2.4) wird der mit steigender Rate zunehmende Versatz der Phasenübergangstemperaturen nicht vollständig heraus korrigiert.

Tabelle 2.3: Am Beispiel von Systemen mit vernachlässigbarer Schmelzpunkterniedrigung vorgegebene Messeinstellung am DSC zur Erfassung der Nukleations- und Schmelztemperaturen. Bei wässrigen Lösungen mit stärkerer Gefrier- und Schmelzpunkterniedrigung wurden die Minimaltemperatur beim Abkühlen sowie der Temperaturbereich um das Schmelzsignal dementsprechend herabgesetzt.

Endtemperatur [$^\circ\text{C}$]	Rate [$^\circ\text{C min}^{-1}$]	Haltezeit [min]
+20	--	--
+5	10	1
-50	5	1
-7	10	1
+7	1	--

Für bulk-Messungen wurden 10 μl der zu vermessenden Probe eingesetzt. Abgekühlt wurde hierbei mit -20 oder $-30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, aufgewärmt auch hier mit $+1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ zur genauen Erfassung des Schmelzpunktes. Genaue Informationen bzw. Abweichungen von den hier beschriebenen Messprozeduren sind in der Auswertung 3 an der entsprechenden Stelle beschrieben.

2.2.2.3 Auswertung der DSC-Thermogramme

Zur Steuerung des Kalorimeters und Einstellung der Temperaturrampen sowie zur Datenaufnahme und -speicherung wird die zu dem Messgerät gehörende Software **TA Analysis Explorer** genutzt. Die bezüglich der Temperatur kalibrierten Thermogramme (s. **Abschnitt 2.2.2.4**) wurden entweder im Programm **Universal Analysis** oder in **Origin Pro** (DSC_Calibration_2015_Okt; DSC_Calibration_2016_Feb; Engdahl, 2015) ausgewertet. Im Folgenden wird an Beispielen die Bestimmung der Phasenübergangstemperaturen dargestellt, die in beiden Analyseprogrammen auf denselben Methoden beruht und gleiche Ergebnisse liefert.

Aus den bei den Messungen erhaltenen DSC-Thermogrammen werden die Eisknucleationstemperaturen über das Onset-Verfahren (Angell, 2002) bestimmt. Diese Temperatur entspricht für monodisperse Tropfen etwa dem T_{10} -Wert (Riechers et al., 2013), also der Temperatur, bei der 10 % der Tropfen gefroren sind, und gibt somit die Nucleationstemperatur des Eiskeims gut wider. Die Onsettemperatur ermittelt sich aus dem Schnittpunkt der extrapolierten Basislinie und einer durch den rechtsseitigen Wendepunkt des Nucleationssignals gehenden Tangente, der den Punkt mit maximaler Steigung angibt. In **Abbildung 2.15** ist die Auswertung anhand des Origin-Kalibrationsprogramms am Beispiel einer BPWW-Probe (#B) gezeigt. Die so ermittelten Werte für Onset- und Wendepunkt werden automatisch in einer Datentabelle ausgegeben.

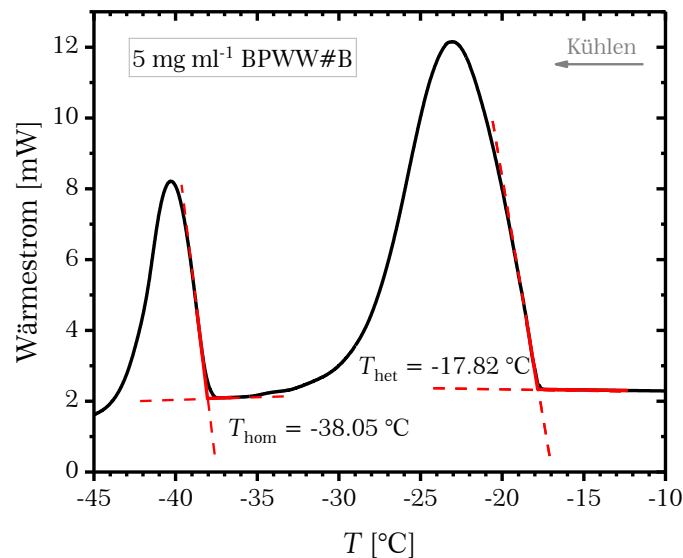


Abbildung 2.15: Die Nucleationstemperatur ergibt sich über die Bestimmung der Onsettemperatur. Der Schnittpunkt der extrapolierten Basislinie und einer an den Wendepunkt des Nucleationssignals gelegten Tangente wird als Nucleationstemperatur gesetzt. Die durchgezogenen roten Linien werden von dem Origin-Programm direkt eingezeichnet.

Die Schmelztemperaturen von verdünnten wässrigen Proben ohne beträchtliche Schmelzpunktniedrigung ($\Delta T_m < 0.5$ °C) werden ebenfalls über die Onsettemperatur des Schmelzsignals erhalten, wie in **Abbildung 2.16** beispielhaft

dargestellt ist. Es ergibt sich für die BPWW-Lösung ein Schmelzpunkt $T_O = -0.04\text{ °C}$, was unter Berücksichtigung einer minimalen Gefrierpunktniedrigung und des Fehlers von $\pm 0.3\text{ °C}$ den Literaturschmelzpunkt von $T_m = 0.00\text{ °C}$ von Wasser (Lide, 2005) sehr gut wiedergibt. Die für den Wendepunkt erhaltene Temperatur von $T_W = +0.7\text{ °C}$ ist generell zu hoch für einen Schmelzpunkt einer wässrigen Lösung, was deutlich aufzeigt, dass die Auswertung über das Onsetverfahren in diesem Fall die geeignetere Variante ist.

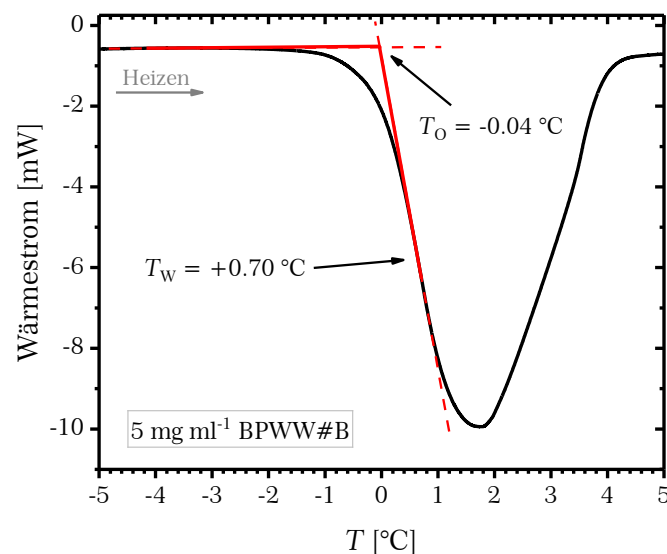


Abbildung 2.16: Vergleich der Onset- und Wendepunkttemperatur für das Schmelzsignal einer wässrigen BPWW-Lösung. Während der Onset T_O mit dem Literaturwert von Wasser ($T_m = 0.00\text{ °C}$ (Lide, 2005)) gut übereinstimmt, liegt der Wendepunkt mit $T_W = +0.7\text{ °C}$ deutlich zu hoch, um in Betracht gezogen zu werden.

Bei hochkonzentrierten wässrigen Lösungen (mit $\Delta T_m \geq 2\text{ °C}$) wird wegen der starken Verbreiterung des Schmelzsignals statt der Onsettemperatur die Temperatur des linksseitigen Wendepunktes des Signals herangezogen (**Abbildung 2.17**). Beim Aufwärmen des sich in einer hochkonzentrierten Matrix befindenden Eises beginnt der Schmelzprozess bei der zu dieser hochkonzentrierten Lösung gehörenden Schmelztemperatur. Durch das Schmelzen des Eises verdünnt sich die umgebende Lösung bis zur ursprünglichen Zusammensetzung, das System bewegt sich dabei entlang der Phasengrenzlinie fest-flüssig. Am Wendepunkt der Schmelzkurve kann der Schmelzprozess als abgeschlossen betrachtet werden (Böttcher, 2009).

Die Schmelztemperaturen bei moderaten Konzentrationen an gelösten Substanzen, die zu einer Schmelzpunktniedrigung zwischen etwa 0.5 und 2 °C führen, sind dagegen weder über das Onsetverfahren noch über den Wendepunkt definiert und können aus den DSC-Thermogrammen daher nur grob abgeschätzt werden.

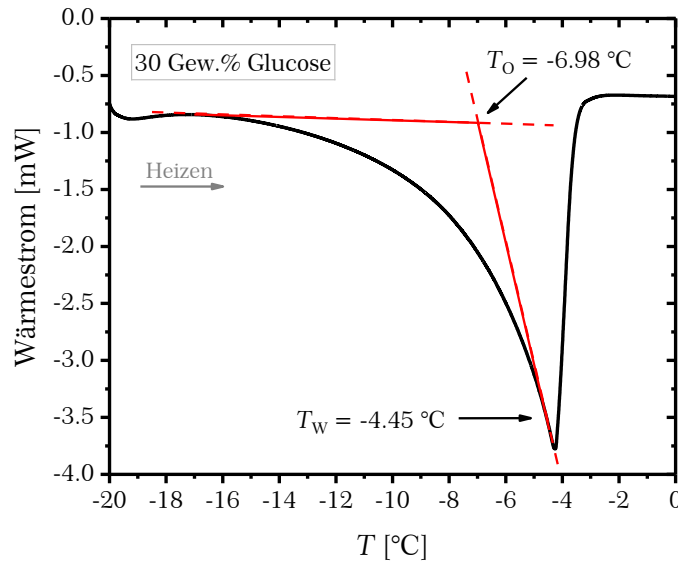


Abbildung 2.17: Durch die Verbreiterung des Schmelzsignals bei einer höher konzentrierten wässrigen Sucrose-Lösung muss der Wendepunkt herangezogen werden zur Ermittlung des Schmelzpunktes.

2.2.2.4 Ratenabhängige Kalibration der Temperatur

Zur möglichst genauen Bestimmung der gemessenen Phasenübergangstemperaturen am DSC müssen die experimentell ermittelten Rohtemperaturen T_{exp} einer Kalibration unterzogen werden. Da der Temperatursensor sich nicht innerhalb der Probe befindet und ein Unterschied zwischen den Wärmekapazitäten der Probe und der Referenz existiert, kommt es zu einer zeitlichen Verzögerung des Wärmetransfers und somit zu einem Temperaturoffset, der mit steigender Rate vergrößert ist. In der zuletzt durchgeführten Kalibration 2011 (Riechers, 2011; Riechers et al., 2013) wurden neun verschiedene Substanzen im Temperaturbereich zwischen -124 °C (149 K) und $+232\text{ °C}$ (505 K) bezüglich ihrer fest-fest- oder fest-flüssig-Phasenübergangstemperaturen bei acht verschiedenen Raten (± 1 , ± 5 , ± 10 und $\pm 15\text{ °C min}^{-1}$) vermessen. Bei der Kalibration wurde sich an der in Pedernera (2008) Pedernera und Böttcher (2009) Böttcher beschriebenen Weise orientiert. Daraus ergab sich schlussendlich Funktion (2.32) mit den zugehörigen Parametern in **Tabelle 2.4** zur Berechnung der kalibrierten Temperatur T_{kal} (Engdahl, 2015).

$$T_{\text{kal}} = y_0 + mT_0(T_{\text{exp}}) + \frac{A}{(T_0(T_{\text{exp}}) - x_0)^2} + T_0(T_{\text{exp}}) \quad (2.32)$$

mit $T_0(T_{\text{exp}}) = T_{\text{exp}} - \alpha T_{\text{exp}} \beta$

und $\alpha T_{\text{exp}} = a_1 + a_2 T_{\text{exp}} + a_3 (T_{\text{exp}})^2$

Tabelle 2.4: Parameter für die DSC-Temperaturkalibrationsfunktion (2.32), aus Engdahl (2015).

y_0 [K]	A [K ³]	x_0 [K]	a_1 [min]	a_2 [min K ⁻¹]	a_3 [min K ⁻²]
-1.2242	7060	285.98	0.24258	-8.939410 ⁻⁴	1.0527·10 ⁻⁶

Die Funktion liefert kalibrierte Temperaturen mit einer Abweichung vom Literaturwert um etwa 0.2 °C im Heiz- und Kühlmodus bei einer Rate von $\beta = \pm 1 \text{ K min}^{-1}$, die auch für höhere Raten trotz höherer Abweichungen angenommen werden kann. Wird desweiteren berücksichtigt, dass die Probe während des Gefrierens Wärme abgibt bzw. beim Schmelzen latente Wärme aufnimmt, der Temperatursensor wegen des kontinuierlichen Heizens aber eine leicht erhöhte Temperatur detektiert, ergibt sich ein großzügigerer Temperaturfehler von $\Delta T_{\text{kal}} = \pm 0.3 \text{ K}$ (Riechers et al., 2013).

2.2.3. Mikrofluidik

Ein weiteres für Nukleationsexperimente angewandtes Messinstrument ist das von L. Eickhoff aufgebaute Mikrofluidik-System (Eickhoff, 2017), mit dem monodisperse Tropfen einer wässrigen Probelösung in einer Ölmatrix auf die Eisnukleationseigenschaften des darin enthaltenen Eiskeims untersucht werden können. Der Aufbau dieser Mikrofluidik-Apparatur, mit der Tropfengrößen von $\sim 100 \mu\text{m}$ zugänglich sind, basiert auf vorherigen Arbeiten von Reicher et al. (2017), die sich dabei an Schmitz et al. (2009) und Riechers et al. (2013) orientiert hatten. Da das Mikrofluidiksystem nicht in dieser Arbeit aufgebaut wurde und zudem lediglich das TmAFP über die Mikrofluidik auf Eisnukleationsaktivität untersucht wurde, wird der Messaufbau nicht detailliert beschrieben, sondern es werden nur die grundlegenden Informationen zum Messaufbau und der Probenpräparation dargelegt.

2.2.3.1 Probenpräparation für die Mikrofluidikexperimente

Die wässrigen Proben tropfen werden in einem Mikrofluidikchip aus PDMS auf einer runden Glasscheibe mit 2.2 cm Durchmesser, der von der Arbeitsgruppe Y. Rudich (Weizmann Institut für Wissenschaften in Rehovot, Israel) zur Verfügung gestellt wurde, generiert. Durch die Anordnung zweier Kanäle für die Ölphase aus Mineralöl (Sigma-Aldrich; Mineralöl M3516) mit 2 Gew.% Span80® als Emulgator (Handelsname für Sorbitanmonooleat) senkrecht zu dem Kanal mit der wässrigen Phase und einer spezifischen Einstellung der Flussraten werden an dem Kreuzungspunkt Wassertropfen mit einer sehr schmalen Größenverteilung gebildet (**Abbildung 2.18**). Diese fließen innerhalb der Ölmatrix in ein anliegendes Tropfengitter mit einer definierten Größe von $90 \pm 10 \mu\text{m}$ Durchmesser und werden dort eingefangen, sobald der Flüssigkeitsstrom abgestellt wird. Dieser Aufbau ermöglicht eine anschließende Untersuchung auf heterogene Eisnukleation in einem Kryomikroskop, worauf in dem nächsten **Abschnitt 2.2.3.2** eingegangen wird.

Die Zuflüsse der beiden Phasen werden über zwei Spritzenpumpen (cetoni® GmbH; Nemesys Niederdruckmodul) und einer Steuereinheit (cetoni® GmbH; Nemesys Basismodul) kontrolliert. Die Flussraten im Bereich von $4 \mu\text{l min}^{-1}$ (wässrige Phase) und $20 \mu\text{l min}^{-1}$ (organische Phase) werden mittels der Software Nemesys User Interface (cetoni® GmbH) gesteuert. Die Beobachtung der Tropfenherstellung erfolgt mit einem Mikroskop (Olympus BX51) bei vierfacher Vergrößerung, zur computergestützten Aufnahme wird eine Kamera (PixeLINK PL-A662) eingesetzt, die über die Software PixeLINK 2004 angesteuert wird.

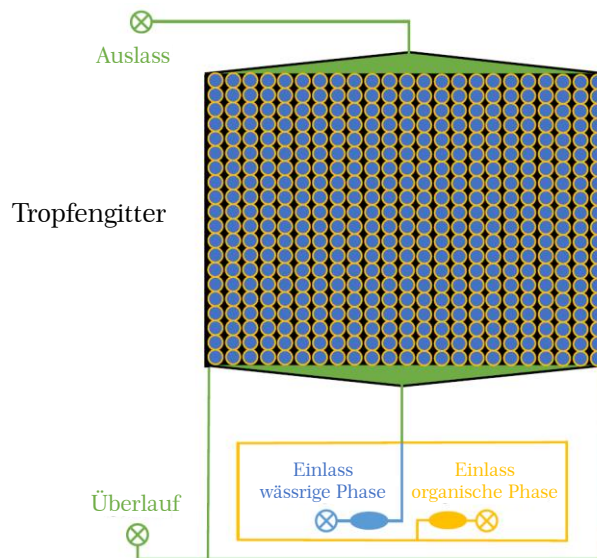


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung des Mikrofluidikchips mit Einlass der wässrigen (blau) und organischen Phase (gelb), dem Kreuzungspunkt, an dem die Emulsion (grün) gebildet wird, sowie dem nachgeschalteten Tropfengitter, in dem die Tropfen für nachfolgende Experimente gehalten werden. Abbildung mit Überarbeitung entnommen aus (Eickhoff, 2017).

2.2.3.2 Messungen am Kryomikroskop

Der präparierte Mikrofluidikchip mit dem gefüllten Tropfengitter wird zur Untersuchung der Eiskernungseigenschaften der wässrigen Probe in einem Kryomikroskop (Olympus BX51) mit fünffacher Vergrößerung einem Kühl- und Heizzyklus unterzogen. Die Kühleinheit des Kryomikroskops besteht aus einer mit flüssigem Stickstoff betriebenen Messkammer (Linkam BCS196) mit einer Temperaturgenauigkeit von $\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ (Linkam Scientific, 2018a). Da nur ein Ausschnitt des gesamten Tropfenarrays im Durchlichtmodus optisch zugänglich ist, werden pro Messung etwa 50-60 Tropfen beobachtet (s. **Abbildung 2.19**). Analog zu den BINARY-Messungen (**Abschnitt 2.2.1.2**) wird auch hier die Temperaturrampe über ein fast äquivalentes auf LabView™ basierendes Programm (Mikrofluidik_2018_Feb) gesteuert, das mit automatischer Tropfenerkennung arbeitet. Wird in diesen vom Programm als Tropfen erkannten Bereichen die Grauwertdifferenz beim Abkühlen um den Wert +5 überschritten, wird die zugehörige Temperatur als Nukleationstemperatur erfasst. Der Schmelzvorgang wird erkannt, wenn beim Aufwärmen die Grauwertdifferenz den Wert -5 unterschreitet. Die Aufnahme der

Bilder mit einer Kamera (Q-Imaging MicroPublisher™ 5.0 RTV) und der Datenpunkte erfolgt ebenso analog zu den BINARY-Messungen (s. [Tabelle 2.1](#)). Aufgrund der Flüssigstickstoffkühlung können auch tiefere Temperaturen als beim BINARY angesteuert werden, was besonders bei wässrigen Lösungen vorteilhaft ist.

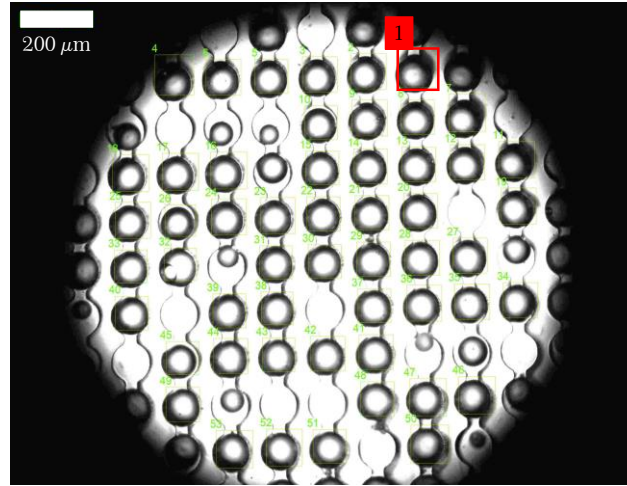


Abbildung 2.19: Aufgenommenes Bild einer Probe im Mikrofluidikchip zu Beginn einer Messung am Kryomikroskop. Durch die automatische Tropfenerkennung werden die vom Programm erfassten Tropfen markiert und durchnummeriert, sodass eine Auswertung ermöglicht wird. Zur Verdeutlichung ist der Tropfen '1' beispielhaft rot hervorgehoben.

Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus und der Einstellungen des Kryomikroskops findet sich in [Kapitel 2.4](#).

2.2.3.3 Temperaturkalibration

Die von der Kühleinheit ausgegebene Temperatur zeigt einen leichten Versatz zu der tatsächlich am Silberblock und aufgrund der verzögerten Wärmeleitung in der Probe herrschenden Temperatur, der zudem temperatur- und ratenabhängig ist. Um möglichst genaue Nukleationstemperaturen zu erhalten, müssen die gemessenen Temperaturen T_{exp} über die Kalibrationsfunktion ([2.33](#)) unter Einbeziehung der Rate β (positiver Wert im Aufwärmmodus, negativer Wert im Kühlmodus) korrigiert werden (Eickhoff, 2018).

$$T_{\text{kal}}[\text{°C}] = (T_{\text{exp}} + \beta[\text{°C min}^{-1}] \cdot 0.17) \cdot 0.97526 - 0.23685[\text{°C}] \quad (2.33)$$

Zur Erstellung der Kalibrationsgleichung wurden die Schmelz- und Nukleationstemperaturen von Wasser bei je drei verschiedenen Heiz- und Kühlraten von ± 1 , ± 5 und ± 10 °C min^{-1} gemessen sowie die eutektischen Übergänge von wässrigen Lösungen von KCl ($T_{\text{eutekt}} = -10.7$ °C), NaCl ($T_{\text{eutekt}} = -21.2$ °C) und MgCl_2 ($T_{\text{eutekt}} = -33.2$ °C) bei einer Heizrate von $+1$ °C min^{-1} bestimmt (Eickhoff et al., 2018). Die Kalibrationsfunktion ist demnach für den Temperaturbereich zwischen -33 °C und 0 °C anwendbar.

2.3. Antigefriereigenschaften von Molekülen

"Fische, die im Nord- oder Südpolarmeer leben, haben einen besonderen Trick, um die Kältezeit zu überleben. Sie haben ein eingebautes Frostschutzmittel. In den Körperzellen und im Blut lagern sich Zucker und Eiweiß ab. Diese Stoffe sorgen dafür, dass der Fisch nicht erfriert. Denn sie hindern Eiskristalle im Körper, die bei der Kälte entstehen, daran, weiter zu wachsen." (Neue Westfälische, 2017)

Was für eine Kinderseite einer Regionalzeitung in wenigen Sätzen und allgemeinverständlich zusammengefasst wird, wird in diesem Kapitel aus wissenschaftlicher Perspektive betrachtet und auf molekularer Ebene ausgeleuchtet. In der Tat müssen sehr viele Details auf physikalischer und physikochemischer Ebene angeführt werden, um diese oberflächlich gehaltene Aussage, dass Moleküle wie Zucker und Proteine im Körper eines in Kälte lebenden Organismus Eiskristalle am Wachsen hindern, zu verstehen.

Der Großteil von mehr als 80 % der Biosphäre der Erde ist kalten Temperaturen von unter +15 °C ausgesetzt. Der Gefrierstress bei Temperaturen unterhalb von 0 °C äußert sich nicht nur in der durch extrazelluläres Gefrieren verursachten mechanischen Zerstörung sowie Aufkonzentration oder gar Austrocknung der Zellen durch Ausströmen von Wasser, sondern auch in einer Verlangsamung des Metabolismus und besonders im Funktionsverlust der Zellmembranen (Margesin et al., 2007). Intrazelluläres Gefrieren würde aufgrund des osmotischen Wasserflusses in die Zelle hinein zu einem Zerbersten selbiger führen, was den Zelltod zur Folge hätte. Die in der Biosphäre lebenden Organismen haben daher zwei verschiedene Mechanismen entwickelt haben, die deren Existenz unterhalb des Gefrierpunkts ermöglichen.

Neben der sogenannten **Gefriertoleranz**, bei der durch kontrollierte Eisbildung in extrazellulären Kompartimenten bei geringen Unterkühlungen das Cytoplasma vor Gefrierschaden geschützt wird (s. auch [Kapitel 2.1.3.2](#)), machen sich auch zahlreiche Lebewesen den Mechanismus der **Gefriervermeidung** zunutze, der einerseits eine Herabsetzung des thermodynamischen Schmelz- und damit auch Gefrierpunktes bedeutet und wodurch andererseits im Zellmedium vorhandene Eiskristalle für den Organismus unschädlich werden (Margesin et al., 2007). Die Bildung von niedermolekularen Substanzen wie Zucker oder Alkoholen wirkt dem Austrocknen des Zellinneren durch Ausströmen von Wasser sowie der daraus folgenden Zellkontraktion als Antwort auf das extrazelluläre Gefrieren entgegen. Außerdem wird dadurch eine kolligative Herabsetzung des Gefrierpunktes erwirkt, die in gefriervermeidenden Organismen mit höheren Konzentrationen an gelösten Substanzen als in gefriertoleranten Organismen dennoch nur etwa zur Hälfte zu den gemessenen Gefrierpunktserniedrigungen beiträgt. Im Jahr 1969 wurde erstmals ein (Glyko-)Protein als Verursacher für den niedrigen Gefrierpunkt und damit auch für

das Überleben von in der Antarktis lebenden Fischen extrahiert (DeVries and Wohlschlag, 1969). Diese sogenannten **Antigefrierproteine (AFP)** oder **Antigefrierglykoproteine (AFGP)**, wenn Zuckermoleküle eine äußere Hülle des Proteins bilden, bewirken über spezifische Adsorption an den vorhandenen Eiskristall eine zusätzliche, nicht-kolligative Gefrierpunktserniedrigung von mehreren °C, die als **Thermische Hysterese (TH)** (**Kapitel 2.3.2**) bezeichnet wird. In gefriertoleranten Organismen mit einer geringer ausgeprägten Thermischen Hysterese von lediglich Zehntel oder Hundertstel Grad, sodass das Gefrieren langsamer, also kontrollierter abläuft, tragen die Antigefrier(glyko)proteine zur Kontrolle der Eisbildung bei, indem sie die **Rekristallisation (Kapitel 2.3.3)** der Eiskristalle verlangsamen, bei der größere Kristalle auf Kosten von kleineren weiter anwachsen würden (Gupta, R. and Deswal, R., 2014a; Bredow, M. and Walker, V. K., 2017). Die Antigefrier(glyko)proteine ermöglichen also eine Existenz von Eiskristallen in einer unterkühlten wässrigen Lösung ohne weiteres Wachstum dieser Kristalle (Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E., 2000). Mit der Adsorption der AF(G)Ps einher geht eine für das Protein spezifische **Strukturierung** eines Eiskristalls (**Kapitel 2.3.1**), der statt einer runden beispielsweise eine hexagonale oder bipyramidale Form annimmt.

Zu den kälteadaptierten Lebewesen gehören vor allem in den nördlichen Breiten bis zum Polarmeer lebende Pro- und Eukaryoten, Pflanzen und ektotherme Tiere, deren Körpertemperatur von der Umgebungstemperatur bestimmt wird. Darunter werden etwa Lebewesen, die stärkeren Temperaturfluktuationen ausgesetzt sind, zu den gefriertoleranten Organismen gezählt, während beispielsweise Fische, die mit einem Plasmaschmelzpunkt von -0.6 °C im polaren Seewasser bei ~ -1.9 °C überleben müssen, den gefriervermeidenden Mechanismus nutzen (Margesin et al., 2007). Die Differenz von 1.3 °C zwischen dem Schmelzpunkt des Organismus und dem höchstmöglichen Gefrierpunkt entstammt der Thermischen Hysterese. Antarktische Fische etwa besitzen AF(G)Ps in ihrem Darm, um durch mit dem Wasser verschluckte Eiskristalle ausgelöstes Gefrieren zu vermeiden. Im Gegensatz zu den Fischen sind einige Insekten weitaus tieferen Temperaturen ausgesetzt, sodass selbst bei zehnfach niedrigeren Konzentrationen von ~ 1 mg ml⁻¹ Hysteresen im Bereich von 2-13 °C gefunden wurden (Duman, 2015). Die AFP-Aktivität ist oftmals im Winter verstärkt im Vergleich zu der in den Sommermonaten. Auch die Resistenz von Pflanzen gegenüber kalten Temperaturen wird durch die klimatischen Bedingungen, wie minimale Temperatur und Dauer der Kälteperiode, beeinflusst (Gupta, R. and Deswal, R., 2014a; Bredow, M. and Walker, V. K., 2017). Das antarktische Bakterium **Marinomonas primoryensis (Mp)** nutzt AFPs am Ende seiner Flagellen zur **Adhäsion** an im Meer schwimmenden Eisschollen, um so besseren Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen zu haben (Bar Dolev et al., 2016a). Die große Schmelzpunkthysterese von bis zu +0.44 °C ermöglicht dem Bakterium, sich bei beginnendem Tauwetter länger an den Eisschollen zu halten (Celik et al., 2010).

Einige Organismen behelfen sich bei hohen Unterkühlungen durch den Übergang der Zellflüssigkeiten in den glasartigen Zustand, sodass sowohl Gefrierprozesse als auch

biochemische Prozesse quasi unterbrochen werden. Ein weiterer Mechanismus zur Vermeidung von Gefrierereignissen könnte eine Entfernung möglicher Eisnukleatoren aus dem Zellmedium oder eine Maskierung derer durch Antigefrierproteine sein (Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E., 2000; Voets, 2017).

2.3.1. Eisstrukturierung

Aufgrund der funktionalen und strukturellen Variabilität der Antigefrier(glyko)proteine besitzen diese unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Flächen des hexagonalen Eiskristalls, die in **Abbildung 2.20** dargestellt sind (Oude Vrielink et al., 2016; Voets, 2017). Durch die Adsorption eines Moleküls an eine spezifische Eisfläche bildet sich beim Wachstum des Eiskristalls eine charakteristische Morphologie aus, die sich von der in reinem Wasser wachsenden flachen Scheibe unterscheidet und somit ein Merkmal der Aktivität der AF(G)Ps darstellt (Budke, C. and Koop, T., 2006).

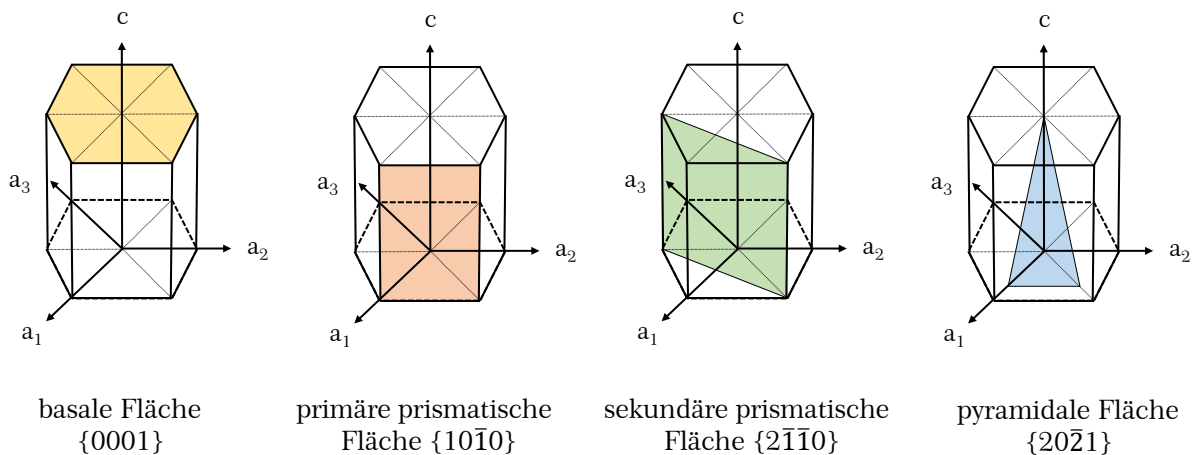


Abbildung 2.20: Flächen der hexagonalen Einheitszelle eines Eiskristalls, an die AF(G)Ps adsorbieren können, mit den Achsen a_{1-3} und c . Die beiden sechseckigen Grundflächen (gelb) werden als basale Flächen bezeichnet, die sechs rechteckigen Seitenflächen (rot) als primäre prismatische Flächen. Desweiteren spielen die sekundären prismatischen (grün) und die pyramidalen (blau) Flächen eine Rolle. Abbildung nach Oude Vrielink et al. (2016)(2016)Oude Vrielink et al.Oude Vrielink et al. und Voets (2017)Voets.

Das Wachstum an den besetzten Flächen ist gehemmt. Die am langsamsten wachsende Fläche bestimmt die Eiskristallstruktur, sodass zum Beispiel Adsorption an den primären (rot) und sekundären prismatischen (grün) Flächen eine hexagonale bzw. stern- oder blumenförmige Struktur ergibt (s. **Abbildung 2.21a**). Einige AFPs vom Typ I und III oder das AFGP 8 (b)) (s. auch **Abschnitt 2.3.5**) binden nicht nur an die prismatischen Flächen, sondern auch an die pyramidalen Flächen, um die basale Fläche zu verkleinern und somit das Wachstum entlang der c -Achse zu beschränken (Voets, 2017). Die (zusätzliche) Adsorption an die basale Fläche kann in einer limonenartigen Form (c); s. auch **Abschnitt 3.3.2.2**) resultieren.

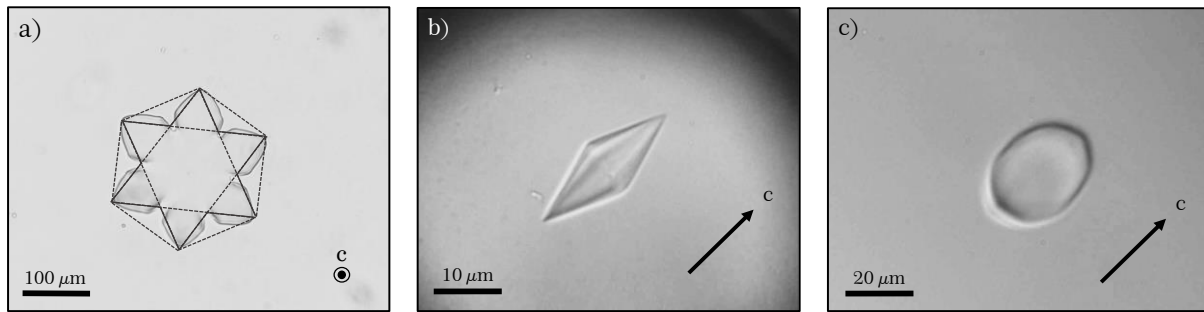


Abbildung 2.21: Verschiedene Ausprägungen der Eisstrukturierung eines Eiskristalls. a) Wachsender Eiskristall in einer Lösung mit Birkenpollenwaschwasser (BPWW) unterhalb des Hysteresegefrierpunktes; die Moleküle binden an die sekundäre prismatische Fläche, was das typische Sternmuster zur Folge hat. b) Die bipyramidale Form bildet sich durch die Adsorption von AFGP 8 an den pyramidalen Flächen. c) Durch Adsorption an die prismatischen und basalen Flächen ergibt sich in einer TmAFP-Lösung eine limonenähnliche Struktur.

Die Eisstrukturierung hat in den Organismen keine physiologische Bedeutung, sondern stellt lediglich einen Nebeneffekt der Adsorption der AF(G)Ps an den Eiskristall dar. Aufgrund der höheren Sensitivität bezüglich der Konzentration als die Thermische Hysterese und die Eisrekristallisationsinhibierung eignet sich die Eisstrukturierung sehr gut zur Erfassung der Antifrieraktivität eines Moleküls.

2.3.2. Thermische Hysterese

Die gefundenen Gefriertemperaturen der Zellflüssigkeiten von AF(G)Ps enthaltene Organismen können nicht alleine mit einer kolligativen Gefrierpunktserniedrigung durch gelöste Substanzen wie Salze, Zucker oder die AF(G)Ps selbst erklärt werden, da diese mit millimolaren Mengen zu gering konzentriert sind. Von Raymond und deVries (1977) wurde ein **Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus** vorgeschlagen, der bis heute trotz einiger Schwächen zur Beschreibung der Entstehung der Thermischen Hysterese (TH) herangezogen wird. Demnach wächst zwischen zwei benachbarten, irreversibel adsorbierten Molekülen das Eis in Form eines Kugelsegments heraus, bis die durch die Krümmung der konvexen Oberfläche erniedrigte Schmelztemperatur der vorherrschenden Temperatur entspricht. Die hervorgerufene, nicht-kolligative Gefrierpunktserniedrigung ist dabei umso stärker ausgeprägt, je kleiner der Radius der Kugel ist, welcher wiederum mit einem kleineren Abstand $d = 2r$ zwischen den adsorbierten Teilchen im Zusammenhang steht (**Abbildung 2.22**). Dies wird durch die **Gibbs-Thomson-Gleichung** oder **Kelvin-Gleichung** (2.34) beschrieben. Die weiteren Größen sind die Grenzflächenspannung σ_{sl} zwischen der festen und flüssigen Phase, das molare Volumen \bar{v}_{Eis} , die Schmelzenthalpie von Wasser ΔH_m sowie der Schmelzpunkt T_{m0} der reinen wässrigen Phase (Yeh, Y. and Feeney, R. E., 1996).

$$\Delta T_H = \frac{2\sigma_{sl}\bar{v}_{Eis}T_{m,0}}{r\Delta H_m} \quad (2.34)$$

Bei einer kritischen Temperatur, bei der der Radius den Wert $d/2$ erreicht, führt weiteres Wachstum zu einer Abnahme der Krümmung und damit zu einer Erhöhung des Gefrierpunktes, sodass das gesamte System instabil wird und es zu einem explosionsartigen Gefrierereignis kommt (Kristiansen, E. and Zachariassen, K. E., 2005). Modellierungsstudien konnten eine Beteiligung des Kelvin-Effekts an der Thermischen Hysterese bestätigen (Kuiper et al., 2015; Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S., 2018).

Die Adsorption der Moleküle verursacht beim Schmelzprozess eine konkave Krümmung des Eises, was eine, geringer ausgeprägte, Schmelzpunkterhöhung bewirkt. Die Differenz zwischen dem Schmelz- und dem Gefrierpunkt wird als Thermische Hysterese bezeichnet. In der sogenannten **Hystereselücke** wächst der Eiskristall bei Verringerung der Temperatur lediglich bis zum durch die Temperatur bestimmten Krümmungsradius, sodass kein makroskopisches Eiswachstum vorliegt.

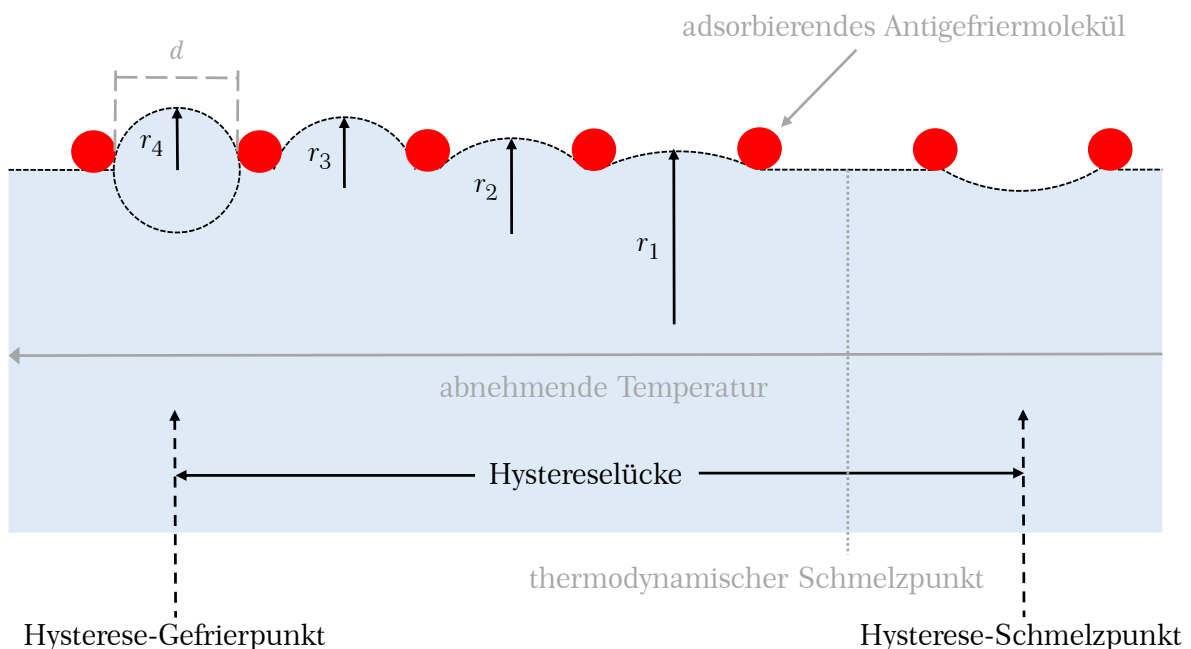


Abbildung 2.22: Zweidimensionale, schematische Darstellung des Adsorptions-Inhibierungsmechanismus von Antigefrierermolekülen, der in einer Hysterese zwischen Gefrier- und Schmelzpunkt resultiert. Mit sinkender Temperatur wird die Krümmung des zwischen den Molekülen herauswachsenden Eises stärker, bis bei Erreichen eines Radius r_1 , der dem halben Abstand $d/2$ zwischen den Molekülen (rote Kreise) entspricht, das Gefrieren schlagartig losbricht. Zu der großen Gefrierpunkt-Hysterese kommt eine kleine Schmelzpunkt-Hysterese aufgrund der konkaven Form des schmelzenden Eises hinzu. Abbildung nach einer Idee aus (Kristiansen, E. and Zachariassen, K. E., 2005).

Dieses Modell beruht auf einer irreversiblen Adsorption der AF(G)Ps, die seit Jahrzehnten Gegenstand von Diskussionen und zahlreichen experimentellen Arbeiten und Modellierungen ist, da sich einige Schwächen des Modells offenbaren. Ein irreversibles Adsorptionsverhalten würde eine Bedeckung des Eiskristalls durch alle in der Lösung vorhandenen Moleküle bedeuten. Bei geringeren Konzentrationen

würden dann keine Moleküle in Lösung verbleiben und bei einer vollständigen Belegung des Eiskristalls würde die Konzentration der in Lösung verbleibenden Moleküle keinen Einfluss auf die Hystereseaktivität haben. Jedoch werden sowohl Moleküle in der den Kristall umgebenden Lösung als auch eine Abhängigkeit der Thermischen Hysterese von der (Quadratwurzel der) Konzentration der aktiven Moleküle beobachtet, woraus eine nicht-dauerhafte Adsorption geschlossen werden kann (Kristiansen, E. and Zachariassen, K. E., 2005). Die Hypothese eines Gleichgewichtsprozesses zwischen der Lösung und dem Eiskristall als alternatives Modell zu dem irreversiblen Adsorptionsmechanismus führt zu dem Problem, dass plötzlich frei werdende Stellen auf der Oberfläche des Kristalls in einem Wachstum des Eiskristalls resultieren würden.

Zudem sollten bei einer irreversiblen Adsorption keine unterschiedlichen Aktivitäten zwischen verschiedenen AF(G)Ps bei gleicher Konzentration erwartet werden, was aber experimentell tatsächlich beobachtet wird. In Pflanzen wurden Thermische Hysteresen im Bereich von 0.1-0.5 °C (10^{-1} - 10^1 mg ml⁻¹) mit einzelnen Werten auch bei 0.03 °C (0.1 mg ml⁻¹; Winterroggen) oder 2.19 °C (0.4 mg ml⁻¹, Gemeine Fichte) gemessen (Bredow, M. and Walker, V. K., 2017). In Bakterien liegt die TH-Aktivität bei etwa 0.1-0.3 °C und in Fischen um 2 °C mit Proteinkonzentrationen zwischen etwa 30 und 40 mg ml⁻¹, während in Insekten der Beitrag der AF(G)Ps zur Gefrierpunktserniedrigung bei 2-13 °C liegt trotz zehnfach geringerer Konzentrationen (Voets, 2017). Diese sogenannten **hyperaktiven** Proteine binden nicht nur an die prismatischen Flächen von Eis, sondern auch an die basalen Flächen, sodass sie durch die effektive Vermeidung des Gefrierens aus der basalen Fläche heraus hohe TH-Werte liefern (Scotter et al., 2006). Sie finden sich in gefriervermeidenden Organismen, um eine starke Unterkühlung gewährleisten zu können, während die gefriertoleranten Organismen die **moderaten** AF(G)Ps mit geringen TH-Aktivitäten produzieren.

2.3.2.1 Hyperaktive und moderate AF(G)Ps

Konzentrationsabhängigkeit

Messungen mit dem hyperaktiven Antigegefrierprotein aus der Mehlkäferlarve von *Tenebrio molitor* (TmAFP) und an dem moderaten opAFP III (**ocean pout**; *Zoarces americanus*; Fisch), in denen die den Eiskristall umgebende Lösung gegen eine AFP-freie Pufferlösung ausgetauscht wurde, weisen auf einen irreversiblen Charakter der Adsorption in beiden Fällen hin (Celik et al., 2013; Drori et al., 2015b). Es wurde trotz des Entfernens von AFP aus der Lösung weder Kristallwachstum noch eine Erhöhung der Lösungskonzentration beobachtet. Allerdings wurde bei dem AFP III nach dem Pufferaustausch eine verringerte TH gemessen. Die basale Fläche stellt den Schwachpunkt beim Gefrieren in Lösungen mit moderaten AF(G)Ps dar. Minimierung der Oberfläche der basalen Fläche durch die Stabilisierung anderer

Kristallflächen wie die pyramidale Fläche zögert das Gefrieren hinaus, kann das aber nicht so effizient unterdrücken wie es bei den hyperaktiven Proteinen mit basaler Adsorption der Fall ist. Sowohl die Irreversibilität als auch die Konzentrationsabhängigkeit moderater AF(G)Ps kann mit der Theorie erklärt werden, dass das Eis in die basale Richtung wächst, während die prismatischen Flächen durch irreversible Adsorption blockiert sind, bis die bipyramidale Form gebildet ist und somit die basale Fläche nicht mehr offen liegt. Die TH wird dabei durch die Fähigkeit bestimmt, (weiteres) Wachstum aus der basalen Fläche zu blockieren, wofür Proteine aus der Lösung benötigt werden (Bar Dolev et al., 2016b).

Eine Abhängigkeit von der Konzentration hyperaktiver AF(G)Ps äußert sich über die Besetzung der Eiskristalloberfläche durch das Protein. Es kann eine Korrelation zwischen dem Abstand zwischen den Molekülen und der TH gefunden werden, wie aus **Gleichung (2.34)** vorhergesagt wird (Drori et al., 2015a). Dieses trifft nicht auf moderate AF(G)Ps zu, da diese nicht an die basalen Flächen binden und das Gefrieren am Hysteresegefrierpunkt eine Funktion der freiliegenden basalen Fläche ist.

Zeitabhängigkeit

Die hohe Akkumulationsrate des moderaten AFP III an die prismatischen Flächen mit früh erfolgreicher Sättigung bzw. die geringe Anlagerungsrate an die basalen Flächen des hyperaktiven TmAFP ist eine Erklärung für den beobachteten Anstieg der TH mit der Zeit für hyperaktive AF(G)Ps, während für moderate nahezu keine Zeitabhängigkeit beobachtet werden kann (Drori et al., 2014). Die Schlussfolgerung ist eine Einteilung des Adsorptionsprozesses in zwei Schritte: zunächst erfolgt eine schnelle Adsorption der AF(G)Ps an den Eiskristall, der sich eine langsame, die Hysterese beeinflussende Akkumulation anschließt. Auch hyperaktive Proteine besitzen eine sehr geringe Hystereseaktivität bei niedrigen Messzeiten.

Aufgrund der stärkeren Unterkühlung und dem Wachstum aus der schneller wachsenden prismatischen Ebene heraus kommt es zu einem deutlich explosiveren Gefrieren als bei den moderaten Proteinen, die am Hysteresegefrierpunkt das Wachstum des Eises aus den langsamer wachsenden basalen Flächen nicht mehr stoppen können. Diese hat ein weniger kontrollierbares Wachstum mit größerem Gefährdungspotential für den Organismus zur Folge (Voets, 2017).

2.3.3. Eisrekristallisation: LSW-Theorie

In einer Dispersion aus kleinen und großen Partikeln in einem Medium ist immer eine Auflösung der kleineren Partikel zu beobachten, während die größeren anwachsen. In der Folge bilden sich immer weniger, aber größere Partikel. Die Triebkraft dieses Reifungsprozesses, der von Wilhelm Ostwald 1900 zuerst beschrieben wurde und heute als **Ostwald-Reifung** allgemein bekannt ist (Ostwald, 1900), ist eine Verringerung der Gesamtgrenzfläche der dispergierten Partikel und damit ein thermodynamisch getriebener Prozess. Die Kinetik der **Rekristallisation**

wurde von Carl Wagner (Wagner, 1961) und unabhängig davon von I. M. Lifshitz und V. V. Slyozov (1961) beschrieben. Diese **LSW-Theorie** setzt sich zusammen aus der Kelvin-Gleichung, die die thermodynamischen Eigenschaften einer gekrümmten Oberfläche einbezieht (vgl. **Gleichung (2.34)**), und dem ersten Fickschen Gesetz, das die Diffusion der Teilchen zwischen den Partikeln behandelt. Die Diffusion eines Teilchens von einem kleinen auf ein großes Partikel kann als der für den Reifungsprozess geschwindigkeitsbestimmende Schritt betrachtet werden. Unter der Annahme, dass der Abstand zwischen den Partikeln relativ zu der Partikelgröße groß ist und somit der Volumenanteil Q_v der dispergierten Partikel an der gesamten Dispersion nahezu Null ist, ergibt sich aus der LSW-Theorie eine lineare Entwicklung des kubischen mittleren Partikelradius \bar{r}^3 mit der Zeit t (**Gleichung (2.35)**) (Budke et al., 2009; Budke, 2010).

$$\bar{r}^3(t) = \bar{r}_0^3 + k_{\text{LSW}}t \quad (2.35)$$

Dabei ist \bar{r}_0 der mittlere Radius zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Proportionalitätskonstante k_{LSW} wird als **diffusionskontrollierte Ratenkonstante** bei einem verschwindend geringen Eisanteil ($Q_v \rightarrow 0$) bezeichnet und kann über **Gleichung (2.36)** ausgedrückt werden.

$$\lim_{Q_v \rightarrow 0} k_d = k_{\text{LSW}} = \frac{8\sigma_{\text{sl}}v_{\text{Eis}}^2 D_w(T)c_{\text{w,eq}}}{9RT} \quad (2.36)$$

Aus der Kelvin-Gleichung kommen die Beiträge durch die Grenzflächenspannung zwischen der festen und flüssigen Phase, σ_{sl} , durch das molare Volumen, v_{Eis} , sowie die Gaskonstante R ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Lide, 2005)) und die Temperatur T . Desweiteren stellen $D_w(T)$ die temperaturabhängige Diffusionskonstante eines Wassermoleküls in einer Lösung und $c_{\text{w,eq}}$ die Konzentration von Wasser in der Lösung im Gleichgewicht mit einem Eiskristall unendlicher Größe aus dem Diffusionsgesetz dar (Budke et al., 2009).

Das Modell einer Dispersion kann auch auf einen polykristallinen Eisfilm übertragen werden, in dem bei einer konstanten Temperatur und damit konstantem Eisvolumenanteil $Q_v = (Q_{\text{Eis}}/(Q_{\text{Eis}} + Q_{\text{Wasser}}))$, weil das System im thermodynamischen Gleichgewicht steht, unterhalb der Schmelztemperatur ebenfalls die Ostwaldreifung beobachtet werden kann. In diesem Fall wird häufig von **Eisrekristallisation** gesprochen. Wie aus **Gleichung (2.34)** erkennbar ist, haben größere, weniger gekrümmte Eiskristalle einen höher liegenden Schmelzpunkt, weshalb sie auf Kosten der kleineren, stärker gekrümmten Kristalle weiter anwachsen (s. **Abbildung 2.23**), sodass sich deren Anzahl N ändert. Auch die LSW-Theorie kann auf das System Wasser-Eis angewendet werden. Die Theorie unterliegt jedoch der grundlegenden Annahme eines Volumenanteils dispergierter, hier kristalliner, Partikel nahe Null, was in Experimenten nicht realisiert werden kann. Bei in Experimenten üblichen höheren Volumenanteilen und dem daraus resultierenden abnehmenden Abstand der Partikel zueinander ist eine theoretische Beschreibung durch die Überlagerung der

Diffusionsfelder benachbarter Partikel erschwert. Ein einfacher Ansatz über das Molekularfeldpotential $\alpha = r/r_c$ (Voorhees, P. W. and Glicksman, M. E., 1984), das das Verhältnis des mittleren Partikelradius r und des kritischen Radius r_c , der ein weder wachsendes noch sich auflösendes Partikel darstellt, beschreibt, führt einen die Abhängigkeit der Ratenkonstante vom Eisanteil Q_v berücksichtigenden Ausdruck für die diffusionslimitierte Ratenkonstante k_d ein (Budke et al., 2009; Budke, 2010). Bei höherem Eisanteil sinkt der Abstand der Eiskristalle voneinander, sodass die Wassermoleküle schneller von einem Kristall zu einem anderen über die wässrige Phase gelangen, was sich in einem höheren Wert für die Ratenkonstante niederschlägt.

$$k_d(Q) = k_{d0} \frac{\alpha^3}{1 - pQ^{1/3}} \quad (2.37)$$

Für $Q_v < 0.4$ zeigt sich eine lineare Eisanteilabhängigkeit von α mit $\alpha = 1 - 0.15 \cdot Q_v$, sodass α daher für die in den Experimenten üblichen Eisanteile um $Q_v = 0.1$ näherungsweise als 1 gesetzt werden kann. Höhere Eisanteile führen zu einer Aggregatbildung benachbarter Eiskristalle und würden die theoretische Beschreibung der Rekristallisation weiter komplizieren, weshalb sich in Experimenten, auch wegen der besseren Kristallerkennung, auf kleinere Eisanteil beschränkt werden sollte. Für einen theoretischen Eisanteil von Null sollte $k_{d0} = k_d(0)$ identisch mit k_{LSW} werden. Der Parameter p berücksichtigt die Temperaturabhängigkeit (Budke et al., 2009).

2.3.3.1 Eisrekristallisationsinhibierung (IRI)

Durch die Adsorption von Antiegefrier(glyko)proteinen an die Oberfläche der Eiskristalle wird die Eisrekristallisation durch die Hinderung des Einbaus weiterer Wassermoleküle in den Eiskristall inhibiert (engl. **Ice Recrystallization Inhibition; IRI**). Die Änderung der Kristallgröße und -anzahl mit der Zeit verläuft bei Anwesenheit von AF(G)Ps langsamer (s. **Abbildung 2.23**), weil hier der flüssig-fest-Phasenübergang der geschwindigkeitsbestimmende Schritt gegenüber der Diffusion eines Wassermoleküls in der wässrigen Lösung ist. Daher muss die **Gleichung (2.35)** um einen die Wachstumsinhibierung beschreibenden Term ergänzt werden, woraus sich folgende **Gleichung (2.38)** ergibt (Budke et al., 2009; Budke, 2010).

$$r^3(t) = \underbrace{(1 - \beta(t)) \cdot (r_0^3 + k_d(Q) \cdot t)}_{\text{Diffusionslimitierung}} + \underbrace{\beta(t) \cdot (r_{h0}^3 + k_1 \cdot t)}_{\text{Wachstumsinhibierung}} \quad (2.38)$$

Diffusionslimitierung

Wachstumsinhibierung

Dieser Prozess der Rekristallisationsinhibierung wird durch die **wachstumsinhibierte Ratenkonstante** k_1 beschrieben. Der Parameter $\beta(t)$ (**Gleichung (2.39)**) mit Werten zwischen 0 und 1 gibt an, welcher der beiden Prozesse zu einem Zeitpunkt der ratenbestimmende ist (Budke et al., 2009).

$$\beta(t) = \frac{1}{1 + \exp(t_s - t)} \quad (2.39)$$

Nimmt $\beta(t)$ einen Wert < 0.5 an, dominiert die Diffusion den Rekristallisationsprozess, bei Werten > 0.5 limitiert die Adsorption von Molekülen die Geschwindigkeit der Rekristallisation, wobei r_{h0} der hypothetische Radius zum Zeitpunkt $t = 0$ ist. Wenn zu einem Zeitpunkt t_s der Wechsel von Diffusions- zu Adsorptionskontrolle eintritt, ergibt sich für $\beta(t_s)$ ein Wert von 0.5. Tritt dieser Fall innerhalb der Messzeit ein, ist der Wechsel anhand einer Änderung in der Steigung der entsprechenden $r^3(t)$ -Kurve von k_d zu k_i zu beobachten (s. **Abbildung 2.24**; rote Datenpunkte). Aufgrund der Oberflächenverringerung der Eiskristalle durch die Ostwald-Reifung kommt dem inhibierenden Effekt durch die AF(G)Ps erst mit zunehmender Zeit eine Bedeutung zu, was bei moderaten Konzentrationen typisch ist. Bei besonders hohen Konzentrationen an inhibierenden Molekülen nähert sich t_s dem Wert 0, sodass $\beta(t)$ mit der Zeit gegen 1 strebt. Demnach fällt der erste Term der **Gleichung (2.38)** weg und die Steigung der Messkurve entspricht der wachstumsinhibierten Ratenkonstante k_i . Bei niedrigen Mengen an AF(G)Ps übersteigt t_s den maximalen experimentellen Zeitwert und $\beta(t)$ nimmt Werte zwischen Null und 0.5 an. Die Inhibierung wird mit abnehmender Konzentration ($\beta \rightarrow 0$) vernachlässigbar und die Steigung von $r^3(t)$ liefert die Ratenkonstante k_d .

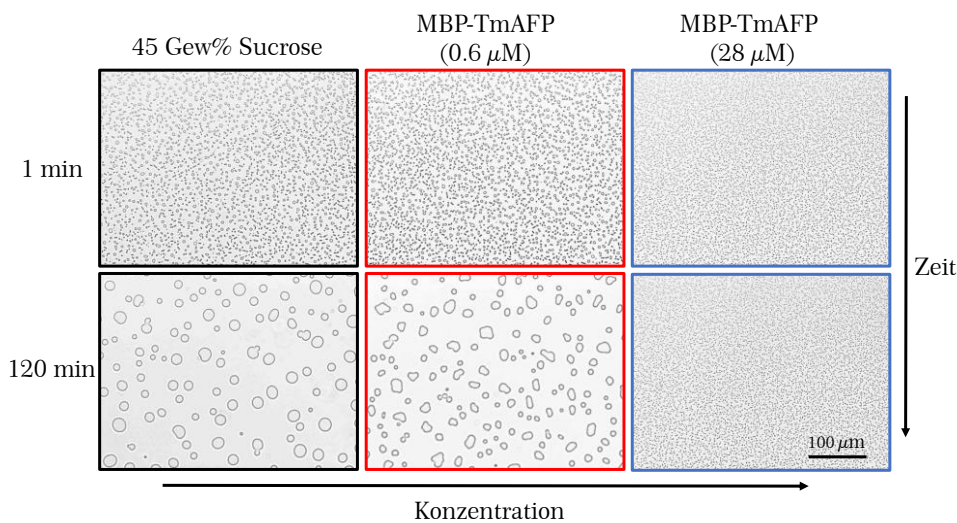


Abbildung 2.23: Ostwald-Reifung eines polykristallinen Eisfilms führt über die Zeit zur Bildung weniger, großer Eiskristalle, wie das Beispiel der wässrigen 45 Gew%-igen Sucroslösung als Referenzmedium nach 120 min (schwarz umrandet) zeigt. Bei Anwesenheit eines eisbindenden Moleküls (hier MBP-TmAFP) wird die Rekristallisation verlangsamt, sodass bei moderater AFP-Konzentration (rot) nach 120 min noch einige kleine Kristalle verbleiben und bei genügend hoher Konzentration (blau) sich die Kristallgröße über die Zeit quasi gar nicht verändert. Die Rekristallisation ist dann vollständig inhibiert. Zu beobachten ist bei der moderat konzentrierten AFP-Lösung eine Strukturierung der Eiskristalle, die aus der Adsorption der AFPs an die prismatischen (und basalen) Kristallflächen resultiert.

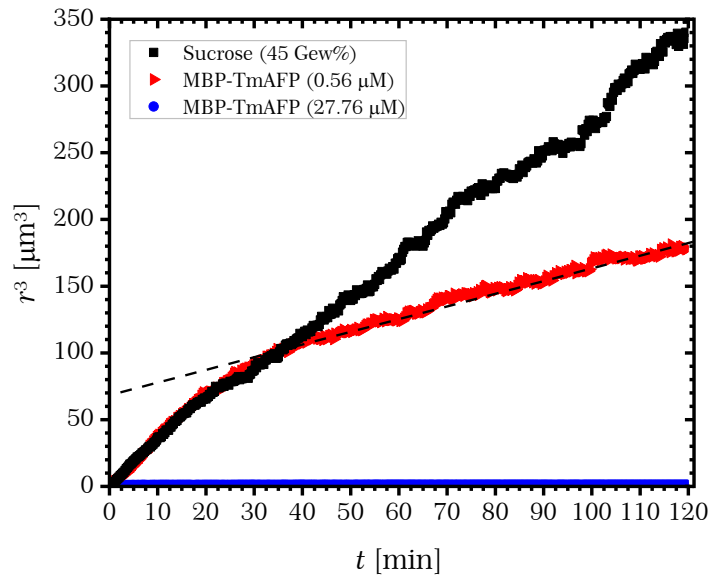


Abbildung 2.24: Graphische Darstellung des kubischen mittleren Radius r^3 der Eiskristalle in einem polykristallinen Eisfilm gegen die Zeit t (vgl. [Abbildung 2.23](#)). Wie nach der LSW-Theorie vorhergesagt steigt r^3 für eine reine wässrige Lösung (hier 45 Gew% Sucrose, schwarz) linear mit der Zeit an, da vollständige Diffusionskontrolle vorliegt. Bei moderaten Konzentrationen an eisbindenden AFPs (MBP-TmAFP; rot) setzt nach 35 min das AFP-kontrollierte Wachstum ein, erkennbar an der abnehmenden Steigung, die durch die wachstumsinhibierte Ratenkonstante k_i ausgedrückt ist. Bei sehr hoher Konzentration an dem AFP (blau) wird die Rekristallisation vollständig inhibiert, sodass die Steigung nahezu Null ist. Der Eisanteil Q_v ist bei allen drei Messungen ~ 0.11 , sodass die Messungen direkt vergleichbar sind.

Da einerseits die zugrundeliegende LSW-Theorie von einem Eisanteil nahe Null ausgeht und andererseits eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Messtechniken für auf einen Eisanteil von Null extrapolierte Ratenkonstanten k_{10} gegeben ist, werden die über lineare Anpassung mit [Gleichung \(2.38\)](#) an die experimentell erhaltenen Daten erhaltenen Ratenkonstanten k_1 mithilfe von [Gleichung \(2.40\)](#) auf einen Eisanteil von Null korrigiert (Budke et al., 2009). Zudem wird die Eisanteilabhängigkeit der Ratenkonstanten selbst eliminiert. Die genaue Vorgehensweise zur Berechnung von k_{10} ist in [Anhang A.2](#) beschrieben.

$$k_{10}(Q) = \frac{k_{d0}k_1(Q)}{k_d(Q)} \quad (2.40)$$

Unterschiede in den Messbedingungen wie Haltetemperatur, Kühlrate oder Nukleationstemperatur, die die Kristallgröße beeinflussen, sowie der Probenzusammensetzung erschweren einen Vergleich der Ergebnisse unterschiedlicher Aufbauten (Voets, 2017).

2.3.3.2 IRI-Konzentrationsabhängigkeit

In konzentrationsabhängigen Experimenten zeigt sich ein sigmoidaler Verlauf der Ratenkonstante $k_{10}(Q)$ mit Variation der Konzentration c an

Antigefrier(glyko)proteinen (s. **Abbildung 2.25**), der über die **Hill-Gleichung (2.41)** ausgedrückt werden kann (Budke, 2010). Dabei wird der untere Grenzwert von vornherein als Null gesetzt.

$$k_{10}(c) = k_{d0} - \frac{k_{d0}}{1 + \left(\frac{c_i}{c}\right)^s} \quad (2.41)$$

In einer reinen wässrigen Lösung ohne inhibierende Substanzen wird die Eisrekristallisation nicht beeinflusst und die Diffusion der Wassermoleküle in der Lösung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, sodass die Ratenkonstante einen maximalen Wert von $k_{d0} = k_{LSW}$ annimmt. Mit zunehmender Konzentration c an AF(G)Ps wird die Rekristallisation durch die an die Eiskristalle adsorbierenden Moleküle immer stärker gehemmt, bis das Wachstum bzw. die Ostwald-Reifung vollständig gestoppt wird und die Ratenkonstante k_{10} gegen Null strebt. Als Charakteristikum für die Aktivität eines eisrekristallisationsinhibierenden Moleküls hat sich der Konzentrationswert c_i etabliert (Budke et al., 2014; Olijve et al., 2016b; Mangiagalli et al., 2017), der den Wendepunkt der Sigmoidalkurve interpretiert, bei dem die Rekristallisation bzw. k_{d0} um den Faktor 0.5 reduziert ist. Dieser Punkt kann auch als Wechsel zwischen diffusionslimitiertem und inhibiertem Wachstum bezeichnet werden. Der Exponent s beschreibt die Krümmung der S-Kurve und ist ohne tiefere physikalische Bedeutung.

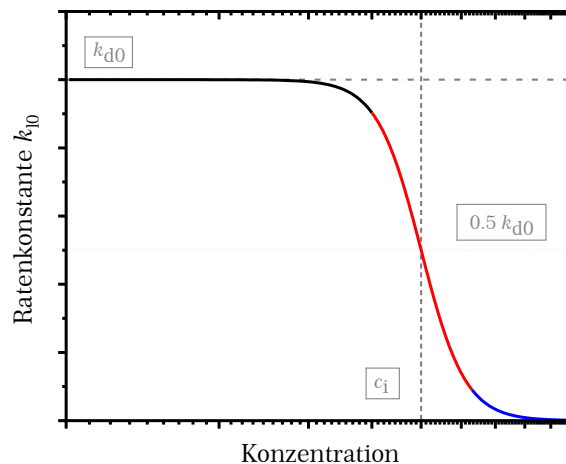


Abbildung 2.25: Schematische Graphik zur Veranschaulichung des S-Kurven-Verlaufs der Ratenkonstante k_{10} in Abhängigkeit von der Konzentration c . Bei hoher Konzentration (blauer Bereich) nimmt die Ratenkonstante einen Wert nahe Null an, da eine vollständige Wachstumsinhibierung vorliegt. Mit abnehmender Konzentration ist die Hemmung des Kristallwachstums weniger stark ausgeprägt (rot), bis die Ratenkonstante k_{d0} in einer reinen wässrigen Lösung erreicht wird (schwarz). Die für ein AF(G)P charakteristische Konzentration c_i kann dem Wendepunkt entnommen werden, wenn die Ratenkonstante k_{d0} auf den halben Wert abfällt.

Die beschriebene Vorgehensweise zur Auswertung der Eisrekristallisationseffizienz eisbindender Moleküle wurde von Budke et al. (2014) unter dem Apronym **IRRINA** (Ice Recrystallization Rate Inhibition Analysis) zusammengefasst.

2.3.4. Molekularer Mechanismus der Eisaffinität

Der in **Kapitel 2.3.2** dargelegte Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus liefert eine gut verständliche Erklärung der Aktivität von Antigefrieremolekülen, jedoch fehlt ihm die physikochemische Grundlage der Funktionsweise. Warum adsorbieren Moleküle spezifisch an einen Eiskristall und warum ist diese Protein-Eis-Wechselwirkung energetisch vorteilhaft gegenüber der Wechselwirkung mit Wassermolekülen? Welche strukturellen Voraussetzungen muss die eisbindende Stelle (engl. **Ice Binding Site**; **IBS**) erfüllen, damit das Molekül an das Eis adsorbiert?

Es wurden drei grundsätzliche Hypothesen des molekularen Mechanismus vorgeschlagen, von denen die dritte, wie in Modellierungen in den letzten Jahren gezeigt werden konnte, die mittlerweile wahrscheinlichste ist (s. **Abbildung 2.27**; S. 71).

1. Zu Wasserstoffbrückenbindungen fähige funktionelle Gruppen an der IBS bilden eine gute Übereinstimmung mit dem Kristallgitter von Eis.

Die Abstände der funktionellen Gruppen in der Kristall- oder Lösungsstruktur des Antigefrieremoleküls, die in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen, entsprechen denen der Wassermoleküle in der Einheitszelle von Eis. Die Seitenlängen der primären prismatischen Flächen betragen $a = 4.52 \text{ \AA}$ und $c = 7.35 \text{ \AA}$ (s. **Abbildung 2.26**; rot). Eine Adsorption an der basalen Fläche setzt Atomabstände im Molekül von beispielsweise 7.83 \AA voraus, die auch bei an die sekundäre prismatische Fläche bindenden Molekülen vorhanden sind (grün). Eine bipyramidale Eisstrukturierung resultiert aus der Adsorption an die Diagonale innerhalb der Einheitszelle (blau), die sich auch über mehrere Einheitszellen erstrecken kann. Für ein AFP I wurde eine Wiederholungseinheit von 16.7 \AA ausfindig gemacht (Sicheri and Yang, 1995). Diese strukturelle Übereinstimmung konnte, häufig in Form von Threonin-OH- oder Asparagin(-säure)-gruppen, für zahlreiche Proteine tatsächlich gefunden werden, weshalb 1991 von Knight et al. zunächst diese Hypothese für die Adsorption der AF(G)Ps an Eis aufgestellt wurde.

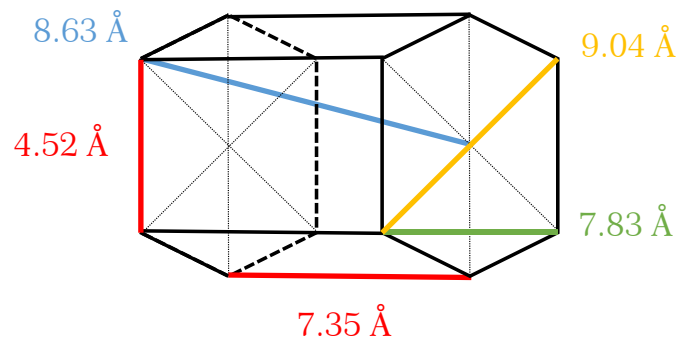


Abbildung 2.26: Einheitszelle eines Eiskristalls mit den Seitenlängen $a = 4.52 \text{ \AA}$ und $c = 7.35 \text{ \AA}$ (rot) und der Höhe der sechseckigen Grundfläche (basale Fläche) mit $l = 7.83 \text{ \AA}$ (grün; entspricht einer Seite der sekundären prismatischen Fläche). Die Eck-zu-Eck-Verbindung (gelb) hat eine Länge von $2a = 9.04 \text{ \AA}$, da die sechseckige Grundfläche aus gleichseitigen Dreiecken besteht. Die Innenraumdiagonale (blau; pyramidale Fläche) hat, ausgehend von der Kante der Grundfläche, eine Länge von 8.63 \AA .

Allerdings wurden auch IBS in Antifrieremolekülen ohne eindeutige Struktur gefunden, sodass diese aufgestellte Hypothese nicht allgemeingültig sein kann (Oude Vrielink et al., 2016). Erste Mutationsexperimente (Haymet, A. D. J. et al., 1999), in denen spezifische Aminosäuren durch Aminosäuren mit u.a. gegensätzlichen chemischen Eigenschaften ersetzt wurden, und MD-Simulationen (Cheng and Merz, 1997) wiesen darauf hin, dass nicht nur Wasserstoffbrücken ausgehend von den funktionellen Gruppen der IBS, sondern auch hydrophobe Effekte eine Rolle spielen. Durch Wechselwirkungen der sich an der hydrophoben Proteinoberfläche bildenden Wasserclathrate mit der ebenfalls vororganisierten Eisoberfläche wird bei der Bindung des Antifrieremoleküls an Eis eine Minimierung der energetisch ungünstigen Wasseranordnungen erreicht. Diese Beobachtungen führten zu zwei weiteren Vorschlägen bezüglich des Eisbindungsmechanismus.

2. Das Molekül bindet mit seiner hydrophoben IBS unter Entropiegewinn durch die in Lösung gehenden Clathratwassermoleküle an die Eisoberfläche

Die sich an der hydrophoben, eisbindenden Stelle des Proteins befindenden Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrückenbindungen untereinander, aber nicht zu dem Protein aus, sodass sie in den sogenannten Clathraten eine geringe Entropie besitzen. Bei Bindung der IBS an das Eis werden diese Wassermoleküle in die Lösung frei gelassen, was einen hohen Entropiegewinn als thermodynamische Triebkraft ergibt (Davies, 2014; Oude Vrielink et al., 2016).

3. Eine eisähnliche Hydrathülle um die IBS fügt sich in die wasserähnliche Eisschicht ein

Zahlreiche vor allem neuere Modellierungsstudien (Garnham et al., 2011a; Kuiper et al., 2015; Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S., 2017; Hudait et al., 2018b) oder spektroskopische Untersuchungen (Ebbinghaus et al., 2010; Meister et al., 2013; Meister et al., 2014; Groot et al., 2016) weisen auf die Bedeutung von 'verankerten' Clathratwassermolekülen (engl. **Anchored Clathrate Waters; ACW**) in der Hydrathülle des Proteins hin. Diese richten sich um die hydrophoben Seitenketten herum aus und bilden Wasserstoffbrückenbindungen mit den hydrophilen Aminosäuren oder dem Proteinrückgrat (Davies, 2014). Die Wassermoleküle in der Hydrathülle sind dadurch zumindest übergangsweise orientiert, sodass sie sich durch ihren eisähnlichen Charakter (engl. **ice-like waters/hydration layer**) mit der flüssigkeitsähnlichen Hydrathülle des Eiskristalls verknüpfen (engl. **quasi-liquid layer**) und somit das Protein über die IBS an die Eisoberfläche bindet (Davies, 2014; Bar Dolev et al., 2016b).

Die nicht eisbindenden Stellen des Proteins (**non ice binding sites: NIBS**) bewirken dagegen eine Verzerrung der Anordnung der Wassermoleküle in der Hydrathülle und verhindern somit ein Weiterwachsen des Eiskristalls um das Protein herum, wie in Modellierungen von (Nutt, D. R. and Smith, J. C., 2008) und (Brotzakis et al., 2018) dargestellt wurde.

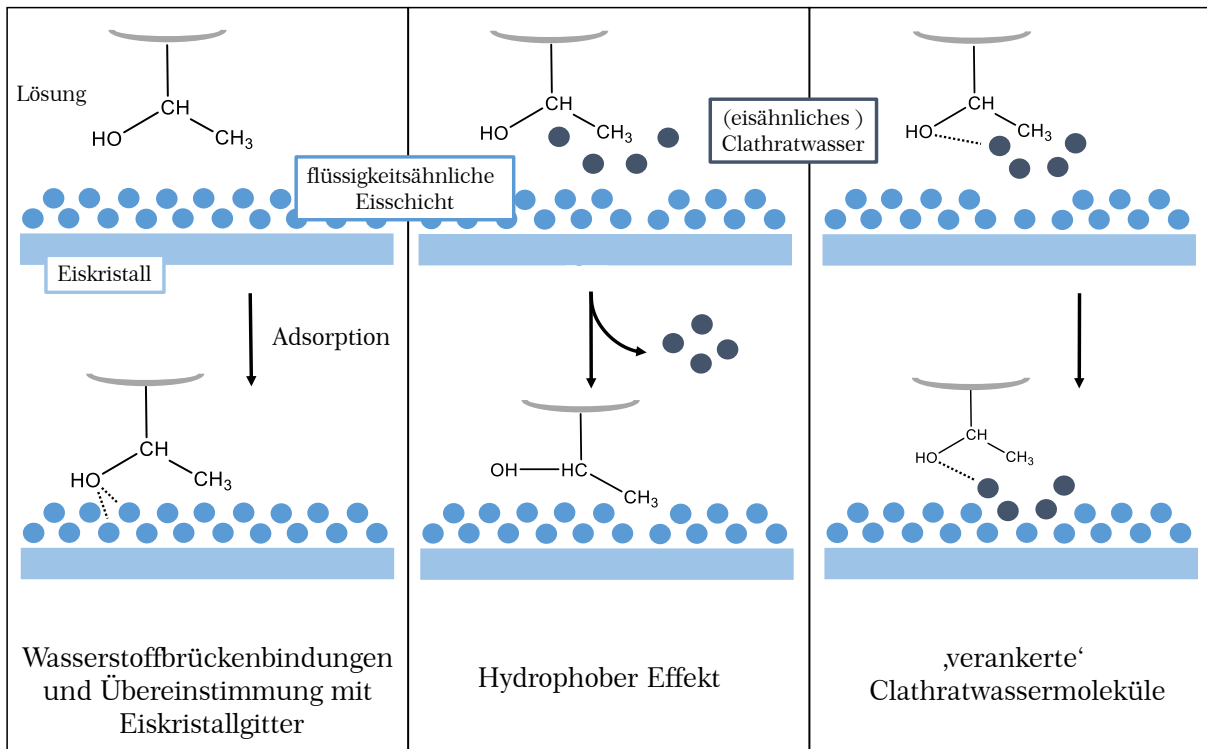


Abbildung 2.27: Schematischer Überblick über die drei Hypothesen des molekularen Mechanismus der Eisadsorption. 1) Durch eine Übereinstimmung der Abstände zwischen den hydrophilen funktionellen Gruppen des Moleküls mit dem Kristallgitter von Eis kommt es zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. 2) Entropiegewinn durch in Lösung gehende Wassermoleküle, die in der Hydrathülle des Proteins ein entropisch ungünstiges Clathrat um die hydrophoben Seitenketten gebildet haben. 3) Wahrscheinlichster Mechanismus für eine Vielzahl von Antigefrieremolekülen: Zusammenspiel von hydrophilen und hydrophoben Effekten, bei dem die eisähnliche Hydrathülle des Proteins, die sich käfigartig um die hydrophoben Proteingruppen anordnen und durch die hydrophilen funktionellen Gruppen verankert werden, und die flüssigkeitsähnliche, geordnete Hydrathülle des Eiskristalls sich zusammenfügen. Abbildung in Anlehnung an Davies (2014).

Der tatsächliche und genaue Mechanismus bleibt weiterhin ein großes Diskussionsthema. Es kommt die Frage auf, ob eine einheitliche Beschreibung des Mechanismus für sämtliche antigefrieraktive Moleküle gefunden werden kann. Eine Kombination der drei oben genannten Faktoren kann als für die Antigefrieraktivität entscheidend angesehen werden, wobei es Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinklassen gibt (Voets, 2017). Sowohl der hydrophobe Effekt als auch die Fähigkeit, durch Wasserstoffbrücken die Hydrathülle auszurichten, was durch eine Übereinstimmung mit dem Kristallgitter von Eis verstärkt wird, tragen zum Beispiel bei MpAFP (Garnham et al., 2011a) und TmAFP (Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S., 2017) zu der Antigefrieraktivität bei. Die Wassermoleküle in der Hydrathülle sowohl des Antigefrieremoleküls als auch des Eiskristalls sind von zentraler Bedeutung für eine Vielzahl von Molekülen.

2.3.5. Antigefrier(glyko)proteine

Die für die Antigefrieraktivität in biologischen Organismen verantwortlichen Makromoleküle sind entweder die Antigefrierproteine (AFP) oder Antigefrierglykoproteine (AFGP), welche Disaccharide als die eisbindenden Eigenschaften unterstützende funktionelle Gruppe tragen. Die Disaccharidgruppen befinden sich in dem flexiblen, röhrenartigen Protein auf derselben Seite (Feeney et al., 1986) und sind über die Threonin-OH-Gruppe der Tripeptid-Wiederholungseinheit Alanin-Alanin-Threonin (AAT) mit dem Protein verknüpft (Harding et al., 2003). Da die Anzahl an Wiederholungseinheiten (AAT)_n mit kleineren Sequenzabweichungen variieren kann, werden die strukturell ähnlichen AFGPs in insgesamt acht Klassen von AFGP 1-8 eingeteilt, wobei die Molmassen von 33.7 kDa (n = 50; AFGP 1) über n = 45, 35, 28, 17, 12 und 6 bis zu 2.6 kDa (n = 4; AFGP 8) reichen. Eine einfachere Einteilung erfolgt in die zwei Gruppen der größeren Proteine AFGP 1-5 und der kleineren Proteine AFGP 6-8. Experimente an Antigefrierglykoproteinen mit chemisch entfernten Disaccharidgruppen zeigen die Bedeutung zumindest einiger Hydroxylgruppen für die Antigefrieraktivität auf (Harding et al., 2003).

Bei Konzentrationen der AFGPs in den Organismen um 35 mg ml⁻¹ können die größeren AFGP 1-5 Thermische Hysteresen von 1.1 °C aufweisen, während die kleineren AFGP 7 oder AFGP 8 den Gefrierpunkt um nur etwa 0.5 °C herabzusenken vermögen (Harding et al., 2003; Bouvet et al., 2006), indem sie an die prismatischen Flächen von Eis adsorbieren.

Neben den AFGPs finden sich auch nicht-glykosylierte Antigefrierproteine (AFPs), die sich dabei nach ihrem Ursprung unterscheiden lassen, ob sie in den in kalten, polaren Regionen lebenden Fischen oder in anderen Gefrierschutz benötigenden Organismen vorkommen. Die Fisch-AFPs sind sehr gut untersucht sowohl bezüglich der Antigefrieraktivität in Form der Thermischen Hysterese und der Eisrekristallisationsinhibierung als auch bezüglich der Struktur und den Eigenschaften der eisbindenden Stelle. Bisher sind vier strukturell voneinander unabhängige Proteine gefunden worden, die nach ihren Strukturmerkmalen klassifiziert werden. Die α -helikalen Typ I AFPs im Molmassenbereich von 3.3 bis 4.5 kDa bestehen zu einem Großteil aus der Aminosäure Alanin und haben eine 11 Aminosäuren umfassende Wiederholungseinheit (Harding et al., 1999). Dabei ist eine minimale Anzahl an etwa 25 Aminosäuren für die Antigefriereigenschaft notwendig. Sie können an die primäre prismatische oder an die pyramidale Fläche des Eises adsorbieren und moderate Thermische Hysteresen bis zu 0.7 °C bei einer Konzentration von 10 mg ml⁻¹ hervorrufen. Die AFP II sind Cystein-haltige globuläre Proteine mit Molmassen von 11-24 kDa, die durch fünf Disulfidbrücken stabilisiert werden und an die sekundäre prismatische Fläche adsorbieren. Die Typ III AFPs sind kleinere globuläre Proteine mit etwa 6-7 kDa Molekulargewicht und einer Affinität für die sekundäre prismatische und pyramidale Fläche. Bislang wurde lediglich ein

AFP IV der Molmasse 12 kDa, das eine höhere Anzahl von Glutamat und Glutamin enthält sowie aus α -Helices aufgebaut ist, im Blut des Seeskorpions gefunden, allerdings in derart niedrigen Konzentrationen, dass eine Antigefrierfunktion eher ausgeschlossen werden kann (Oude Vrielink et al., 2016). Typische Konzentrationen der AFPs im Fischserum liegen bei etwa 30 mg ml^{-1} mit maximal erreichbaren TH-Werten von $2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die AFP I weisen im Vergleich zu Glykoproteinen der gleichen Molmasse eine erhöhte TH-Aktivität auf, aber die der Antigefrierglykoproteine mit molaren Massen größer als 10 kDa übersteigt die Aktivität aller bekannten AFPs. Bei Betrachtung der IRI-Aktivität sind die AFGPs mit sehr kleinen c_i -Werten von $10^{-2} \mu\text{g ml}^{-1}$ (AFGP 1-5) bis $10^{-1} \mu\text{g ml}^{-1}$ (AFGP 8) grundsätzlich deutlich aktiver als die AFPs, sodass die AFGPs die bisher aktivsten Eisrekristallisationsinhibitoren stellen. Die AFP- c_i -Werte liegen dagegen im moderaten Bereich bei $3 \mu\text{g ml}^{-1}$ (AFP III) bzw. $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ (AFP I Variante) (Budke et al., 2014). Hier wird außerdem erkennbar, dass für die IRI-Aktivität deutlich geringere Konzentrationen notwendig sind als für die TH-Aktivität. Typischerweise müssen die AF(G)Ps für die nicht-kolligative Gefrierpunktserniedrigung in millimolaren Mengen vorliegen, während für die Eisrekristallisationsinhibierung mikromolare Konzentrationen ausreichend sind.

2.3.5.1 TmAFP

Struktur

Eines der ersten beschriebenen AFPs aus Insekten war das hyperaktive TmAFP aus der Mehlkäferlarve des *Tenebrio molitor* (Graham et al., 1997; Liou et al., 1999; Liou et al., 2000). Die von Liou et al. (2000) über Röntgenkristallographie aufgeklärte Kristallstruktur (1EZG) stimmt sehr gut mit der Struktur des Proteins in wässriger Lösung (1L1I) überein, wie eine NMR-Untersuchung von Daley et al. (2002) zeigte. Beide Strukturen finden sich mit Angabe der Molaren Masse und Primärsequenz in der öffentlich zugänglichen digitalen Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>; s. **Anhang A.3**).

Das Protein mit einer Molaren Masse von 8.4 kDa bildet eine zylindrische Form mit einer Länge von 32 \AA und einer etwa 8 (Kristall: 6.5) $\text{\AA} \times 14 \text{ \AA}$ großen Grundfläche. Die Primärsequenz des 84 Aminosäuren umfassenden Proteins bilden jeweils 12 Aminosäuren umfassende Wiederholungseinheiten (T(x)CTxSxxCxxAx), die sich zu einer sehr regulären, rechtsgängigen β -helikalen Struktur falten (s. **Abbildung 2.28**). Stabilisiert wird die Helix durch 8 Disulfidbrücken im Inneren des Gerüsts und durch Wasserstoffbrücken zwischen den Peptidbindungen entlang der Wendel. Die 7 jeweils 12 Aminosäuren beinhaltenden β -Schleifen gehen in 6 flache und starre β -Stränge über, welche sich auf einer Seite des Proteins zu einem parallelen β -Faltblatt anordnen und schon von Liou et al. (2000) als eisbindende Stelle vermutet wurden.

Zwei Threonin-Seitenketten aus der TCT-Einheit sind in den 6 β -Strängen mit den Hydroxyl- und Methylgruppen nach außen gerichtet und bilden eine parallele Anordnung an der flachen Seite des Proteins aus. Die Abstände zwischen den Threonin-OH-Gruppen innerhalb dieser TCT-Einheit betragen 7.44 \AA und zwischen den Schleifen auf der längeren Seite des Proteingerüsts 4.64 \AA , sodass diese flache, zweidimensionale Threonin-Anordnung eine sehr gute Übereinstimmung mit der primären prismatischen ($4.52 \text{ \AA} \times 7.35 \text{ \AA}$) als auch, in etwas geringerem Ausmaß, mit der basalen Fläche ($4.52 \text{ \AA} \times 7.83 \text{ \AA}$) des Eiskristallgitters aufweist.

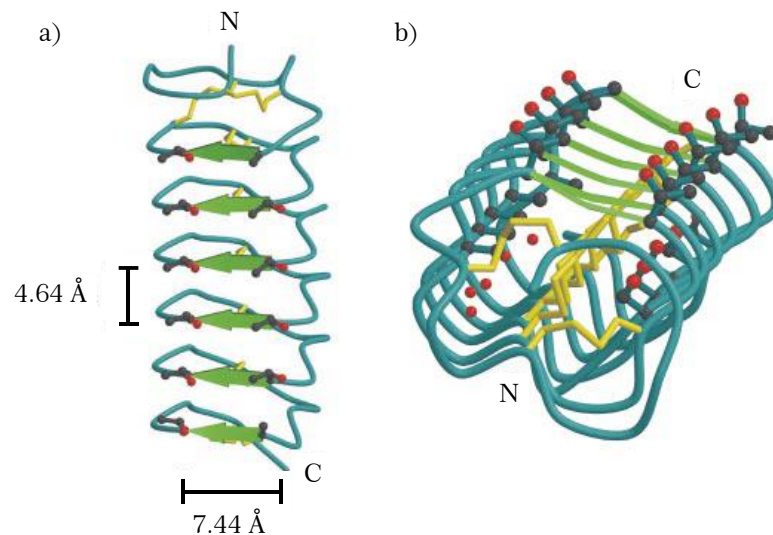


Abbildung 2.28: Kristallstruktur von TmAFP (mit Überarbeitungen aus Liou et al. (2000)). a) Die Seitenansicht zeigt die parallel angeordneten β -Stränge (hellgrüne Pfeile) mit den beiden Threonin-Gruppen (rote Kugeln für O-Atome). Der Abstand zwischen den Threonin-Gruppen eines Stranges beträgt 7.44 \AA , die zwischen den β -Schleifen 4.64 \AA voneinander entfernt sind. b) Aufsicht auf das Proteingerüst zeigt die Disulfidbrücken im Inneren (gelbe Linien) und die flache eisbindende Seite mit den hoch geordneten Threoninseitenketten und nach außen gerichteten OH-Gruppen.

Durch die Adsorption an die basale Fläche zuzüglich der primären prismatischen Fläche ist die Hyperaktivität des Proteins gegeben. Bei Konzentrationen von 0.75 mg ml^{-1} wurde eine Thermische Hysterese von $1.8 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen, die durch einen hyperbolischen Verlauf bei 2 mg ml^{-1} und einer TH von $3 \text{ }^\circ\text{C}$ abflacht (Bar et al., 2008). Es wurden auch Hysteresen von $3.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (0.84 mg ml^{-1} (Drori et al., 2014)) oder $5.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 mg ml^{-1} (Scotter et al., 2006)) beobachtet. Hierbei ist jedoch wichtig zu erwähnen, dass die Hysterese des hyperaktiven Proteins eine besonders starke Abhängigkeit von experimentellen Messbedingungen wie die Kühlrate, Messzeit und Kristallgröße aufweist.

Funktion

Bei den Studien zur Bestimmung der Kristallstruktur von TmAFP wurde die Beobachtung gemacht, dass das Protein als Dimer entlang der β -Faltblätter auskristallisiert. Diese Dimerisierung wird durch eine hoch geordnete Anordnung von Wassermolekülen, die ein Wasserstoffbrückennetzwerk mit den Threonin-OH-Gruppen der TCT-Einheiten aufbauen, erleichtert. Daher ist es naheliegend, dass die β -Stränge mit den TCT-Einheiten bei der Adsorption des Proteins an Eis eine wichtige Rolle spielen. Experimentelle Untersuchungen von Marshall et al. (2002) bestätigten dies, da punktueller Austausch von Threonin durch sterisch anspruchsvollere Aminosäuren die Hystereseaktivität herabsetzte. Eine weitere ebenfalls auf Threonin-Mutationen basierende Studie konnte die Notwendigkeit der Kooperation aller Threonin-OH-Gruppen auf der flachen Seite des Proteins für die Antigefrieraktivität darlegen (Bar et al., 2008). Modellierungsstudien an TmAFP bestätigten die Vermutungen, dass die starren Threonin-Hydroxylgruppen über Wasserstoffbrückenbindungen an die um die hydrophoben Methylgruppen gebildeten Clathratwassermoleküle verknüpft sind und die Antigefrieraktivität über ein eisähnliches Wassermolekülgerüst auf der Oberfläche des Proteins gewährleistet ist (Daley and Sykes, 2004; Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S., 2014, 2017; Hudait et al., 2018b). Die Affinität für die verschiedenen Eisflächen wird durch unterschiedliche ACW-Motive bestimmt (Hudait et al., 2018b). Eine aktuelle Modellierungsstudie von (Hudait et al., 2018a) zeigt für TmAFP auf, dass eine Vororientierung der Wassermoleküle in der Hydrathülle der eisbindenden Stelle nicht vorhanden ist, sondern während der Diffusion des Proteins sich eine mit dem Eiskristall übereinstimmende Organisation der Wassermoleküle ausbildet.

2.4. (Mikroskopische) Methoden zur Analyse der Antigefrieraktivität

Die Eigenschaft eines Moleküls als Antigefriersubstanz äußert sich in einer sich von einem Referenzkristall ohne Anwesenheit eines eisbindenden Moleküls unterscheidenden Änderung der Form oder Größe eines wachsenden Eiskristalls. Daher lässt sich die Antigefrieraktivität in erster Linie über optische Beobachtung unter einem klassischen Lichtmikroskop sehr gut auswerten. Sowohl die Untersuchungen bezüglich der Eisstrukturierung (**Abschnitt 2.4.3**), der Wirksamkeit als Eisrekristallisationsinhibitor (IRI; **Abschnitt 2.4.4**) als auch zur Ermittlung der Thermischen Hystereseaktivität (TH; **Abschnitt 2.4.5**) wässriger Lösungen mit potentiellen eisbindenden Molekülen wurden an einem Kryomikroskop mit für jede Methode speziell ausgearbeiteten Messeinstellungen (Budke, C. and Koop, T., 2006; Budke et al., 2009; Budke, 2010) durchgeführt. Eine Alternative zur Bestimmung der Thermischen Hysterese ist die Wärmestromkalorimetrie, deren Anwendung in diesem Feld im **Anhang A.3** beschrieben wird. Diese Experimente werden generell in konzentrierten wässrigen Lösungen durchgeführt, weil durch den sich ergebenden breiteren Schmelzbereich die Handhabbarkeit erleichtert wird sowie die IRRINA-Messungen bei einem reduzierten Eisanteil möglich sind. Das vierte Kriterium für Antigefrieraktivität ist die Fähigkeit eines Moleküls, an Eis zu adsorbieren und somit in einem Eisblock aus einer Lösung extrahiert zu werden. Eine auf diesem Prinzip der Eisaffinitätsaufreinigung (engl. **Ice Affinity Purification; IAP**), die zuerst von Kuiper et al. (2003) beschrieben wurde, beruhende Messapparatur wurde in dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe eingerichtet und wird im folgenden **Abschnitt 2.4.1** detailliert dargestellt.

2.4.1. Eisaffinitätsaufreinigung

Angelehnt an die von Kuiper et al. Kuiper et al. (2003) zuerst beschriebene Methode zur Aufreinigung von eisbindenden Molekülen über das Einschließen dieser eisaffinen Moleküle in einen an einem Kühlfinger anwachsenden Eisblock, was von den Autoren als **Ice Affinity Purification (IAP)** bezeichnet wurde, wurde zu demselben Zweck in dieser Arbeit eine analoge Apparatur aufgebaut. Ähnliche Aufbauten, die nach dem gleichen Prinzip wirken, wurden zur Extraktion von Antigefrierproteinen auch in anderen Studien angewendet (Basu et al., 2015; Marshall et al., 2016; Haleva et al., 2016; Adar et al., 2018). Von Marshall et al. (2016) wurde der Kühlfinger durch die Innenwand eines Rundkolbens am Rotationsverdampfer ersetzt. Diese Methode ist jedoch nur für hyperaktive Antigefrierproteine anwendbar. Auch diese sogenannte **Ice Shell Purification (ISP)** wurde in dieser Arbeit getestet, ist wegen der mutmaßlichen Beschränkung auf hyperaktive Moleküle allerdings nicht bei den in dieser Arbeit erfolgten Aufreinigungen eingesetzt worden. Eine Beschreibung jenes Aufbaus findet sich im Anhang (**Abschnitt A.5**).

Es wurden in dieser Arbeit zwei verschieden große Vorratsbehälter für die aufzureinigende Lösung eingesetzt, die in **Abbildung 2.29a** gezeigt sind. Eine detailliertere Skizze des Aufbaus der Kühlfingerapparatur ist in **Abbildung 2.29b** dargestellt.

Ein isolierendes Gehäuse mit einem eingefassten Kühlraum, der durch ein externes Kryostat (**HAAKE F3**) mit temperiertem Wasser gespült werden kann, fasst in seiner Vertiefung maximal etwa 20 ml bzw. 250 ml Flüssigkeit, die Verdrängung durch den Kühlfinger eingerechnet. Das Gehäuse befindet sich während der gesamten Aufreinigungsprozedur auf einer Magnetrührplatte, damit die Lösung zur besseren Durchmischung mit einem Magnetrührkern gerührt werden kann. Vor Beginn der Aufreinigung wird an dem auf -0.5 °C eingestellten Kühlfinger ein dünner Eiskranz als Impfeis angefroren. Dazu wird der Kühlfinger in ein Becherglas mit etwa 250 ml sehr kaltem Wasser (max. ca. $+0.5\text{ °C}$), welches wiederum in einer NaCl-Kältemischung von etwa -5 °C steht, getaucht. Wenn sich nach etwa 5-10 min mithilfe von zugegebenen, als Impfkristalle dienenden Eiskristallen aus einer Eismaschine ein Eiskranz gebildet hat, werden zunächst angefrorene Eiskristalle mit einem Glasstab abgestoßen. Anschließend wird der Kühlfinger mit der gewünschten Starttemperatur in die temperierte Lösung getaucht. Bleibt der Eiskranz über mehrere Minuten stabil und zeigt Ansätze von Wachstum, wird die Temperaturrampe an dem Kühlfinger-Kryostaten gestartet. Während die Temperatur der Lösung im isolierenden Gehäuse bei circa 0 °C bzw. dem Schmelzpunkt der Lösung konstant gehalten wird, wird der Kühlfinger durch ein zweites externes Bad mit einer konstanten Kühlrate zwischen -0.05 und -0.1 °C h^{-1} beginnen bei einer Temperatur etwa 0.3 °C unterhalb des Schmelzpunktes bzw. der Temperatur des anderen Bades abgekühlt.

Bei den ersten Aufreinigungen (Birkenpollen Teil 1) wurde für die Temperierung des Kühlfingers das Kryostat **HAAKE F3** genutzt, das jede Stunde manuell um 0.1 °C herabgesetzt werden musste (Kühlrate -0.1 °C h^{-1}), was über Nacht nicht möglich war, sodass die Temperatur zu dieser Zeit konstant gehalten wurde. Bei den folgenden Aufreinigungsprozeduren (Birkenpollen Teil 2; **M. alpina**) wurde das Kryostat **VWR Advanced** mit einer Temperaturgenauigkeit von $\pm 0.02\text{ °C}$ eingesetzt, bei dem eine feste Temperaturrampe voreingestellt werden kann. Bei der großvolumigen Aufreinigung wurde das Eis in etwa 20 h ausgefroren, wobei etwa 100 ml Lösung erhalten wurden, die Aufreinigung mit dem kleinen Behälter ergaben 15 ml nach etwa 3 h. Es ist hierbei ein zusätzliches Anfrieren von Luftfeuchtigkeit zu vermuten, da das System nicht luftisoliert ist.

Die Temperatur des Vorratsgefäßes muss so gewählt werden, dass weder die wässrige Lösung durch eine zu niedrig eingestellte Temperatur an der inneren Gefäßwand gefriert, noch das Impfeis am Kühlfinger wegen einer zu hohen Lösungstemperatur wieder wegschmilzt. Die Temperatur des Kühlfingers sollte knapp unterhalb der für die Lösung eingestellten liegen, damit das Impfeis des Kühlfingers nicht schmilzt, sondern weiteres Eis anwächst. Andererseits hätte eine zu niedrige Temperatur ein zu schnelles Wachstum des Eises am Kühlfinger zur Folge, was sich in einem

spitzenförmigen Herauswachsen des Eises äußert und letztlich keine selektive Extraktion nur der eisbindenden Moleküle mehr gewährleistet ist. Aus demselben Grund sollte die Kühlrate nicht -0.1 °C h^{-1} überschreiten. Ein genügend langsames Wachstum zeigt sich in einem gleichmäßig gewachsenen Eisblock, der keine Lufteinschlüsse aufweist und transparent ist. Daher wird in den meisten Fällen der Aufreinigungszyklus durch Suchen der geeigneten Kühlbad-Temperaturen erst nach mehreren Versuchen gestartet.

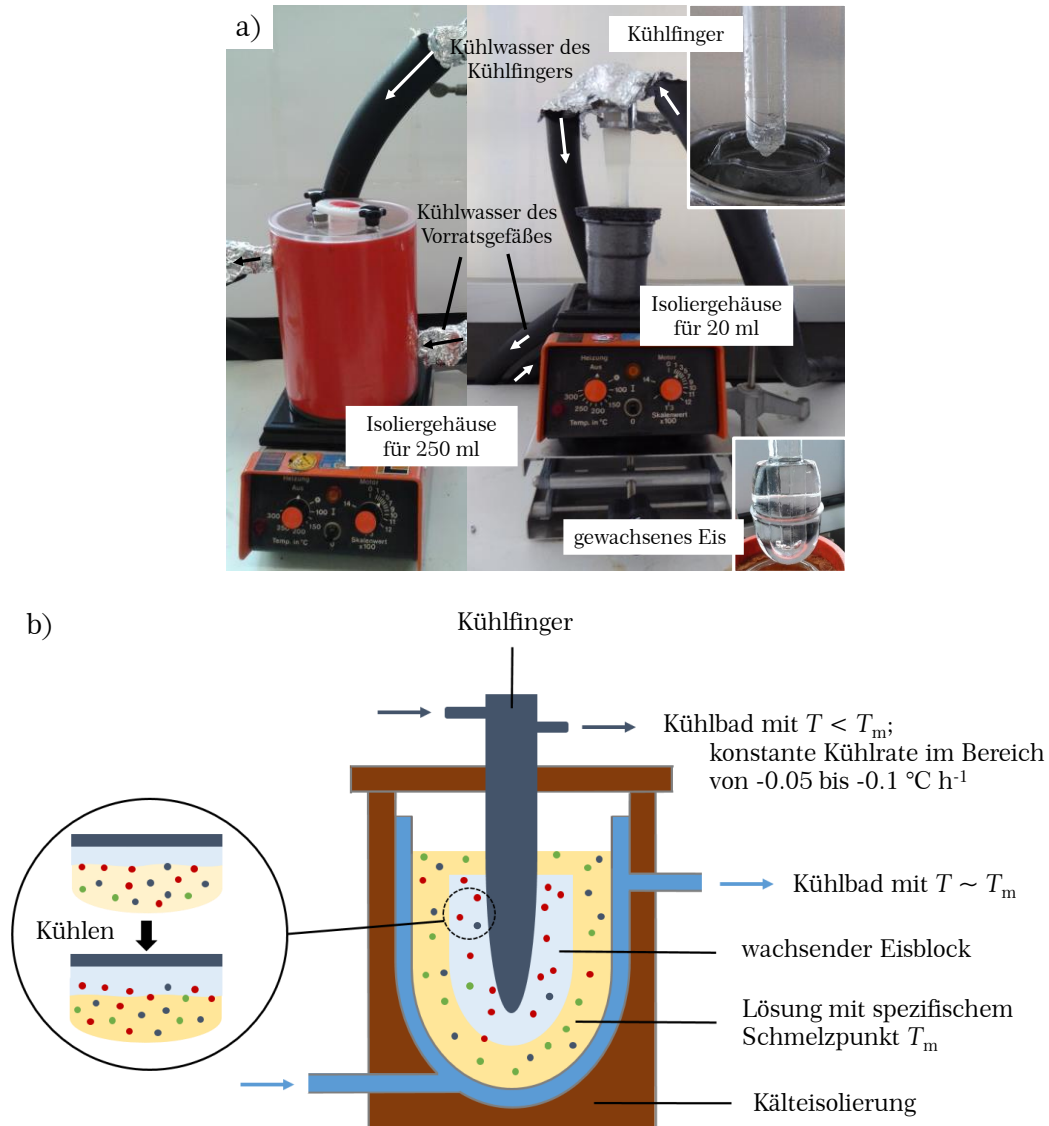


Abbildung 2.29: a) Fotos des Aufbaus zur Eisaffinitätsaufreinigung mit den beiden verwendeten Isoliergehäusen mit unterschiedlichem Fassungsvermögen. Das oben rechts eingeklinkte Bild zeigt das an dem Kühlfinger angefrorene Impfeis, unten rechts ist das durch langsames Kühlen angewachsene Eis gezeigt. b) Querschnitt durch einen prinzipiellen Aufbau der Kühlfingerapparatur. Die selektive Extraktion von Molekülen (rote Punkte) aus einer Lösung, die durch ein Kältebad bei Temperaturen um ihren Schmelzpunkt gehalten wird, gegenüber sonstigen Molekülen (blaue und grüne Punkte) basiert auf deren Eigenschaft der spezifischen Bindung an vorhandenes Eis. Dieses wächst an dem unterhalb des Lösungs-Schmelzpunktes gehaltenen Kühlfinger, der durch ein weiteres Kühlbad mit einer Rate von -0.05 bis max. -0.1 °C h^{-1} kontinuierlich über mehrere Stunden abgekühlt wird. Der wachsende Eisblock enthält schlussendlich anteilmäßig überwiegend eisbindende Moleküle (rote Punkte), während die nicht eisaffinen Moleküle in der Lösung verbleiben.

Das an den Kühlfinger angefrorene Eis wird nach Beendigung der Temperaturrempe rundherum mit wenigen Millilitern kaltem Wasser ($\sim 0\text{ °C}$) abgespült, um restliche Lösung mit unerwünschten Molekülen zu entfernen. Durch Aufheizen des Kühlfingers auf eine Temperatur über 0 °C schmilzt der Eisblock an der Grenzfläche zu dem Kühlfinger und kann in ein separates sauberes Becherglas oder ein weiteres Kühlgehäuse für einen anschließenden zweiten Aufreinigungszyklus gestoßen werden. Der Kühlfinger wird ebenso mit wenig Wasser in das Becherglas abgewaschen. In dem neuen Vorratsbehälter, der mit einer Abdeckung zur Vermeidung von Staub versehen wird, kann der gesamte Eisblock schmelzen. Diese aufgereinigte Lösung oder die restliche Lösung des ersten Aufreinigungszyklus kann in einem nächsten Reinigungsprozess eingesetzt werden.

Die auf diese Weise ein- oder mehrmals aufgereinigten biologischen Proben wurden in dieser Arbeit am Rotationsverdampfer (IKA RV10) unter vermindertem Druck (Wasser: $\sim 20\text{ mbar}$; Membranpumpe (VWR)) in einem Wasserbad (IKA HB 10) bei Raumtemperatur (max. $+25\text{ °C}$) oder bei leicht erhöhter Temperatur (max. $+30\text{ °C}$) aufkonzentriert. Das erhaltene Konzentrat mit einem Volumen um 10 ml wurde dann durch einen $0.2\text{ }\mu\text{m}$ -Spritzenvorsatzfilter (VWR) filtriert, um Staubpartikel zu entfernen. Diese Probe wurde zur weiteren Aufkonzentration nochmals am Rotationsverdampfer auf $\sim 500\text{ }\mu\text{l}$ oder weniger eingeengt, bevor sie über Eisstrukturierungs-, IRRINA- oder TH-Messungen auf Anwesenheit eisbindender Moleküle untersucht und bezüglich der Antiegefrieraktivität quantitativ analysiert wurde.

2.4.2. Aufbau des Kryomikroskops

Bevor auf die einzelnen experimentellen Methoden zur Analyse der Antiegefrieraktivität eingegangen wird, folgt zunächst eine Darstellung des verwendeten Kryomikroskops. Dieses setzt sich zusammen aus einem klassischen Lichtmikroskop (Olympus BX51) und einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kühleinheit (Linkam BCS196), die im optischen Strahlengang eingebaut ist, sodass die Probe während der Messung einer Temperaturrempe ausgesetzt und gleichzeitig beobachtet werden kann. Der flüssige Stickstoff wird aus einem Vorratsbehälter (D2L) über die Stickstoffpumpe LNP 94/2 durch den Silberblock als Objektisch geleitet, der verdampfte Stickstoff wird nach Durchgang durch die Stickstoffpumpenanlage als Spülgasstrom in die Messkammer und über einen weiteren anhängenden Schlauch auf die Abdeckung zurückgeführt (s. **Abbildung 2.30**). Damit wird die Messzelle mit Stickstoffgas gespült und Kondensation von Luftfeuchtigkeit auf dem Deckglas der Abdeckung verhindert.

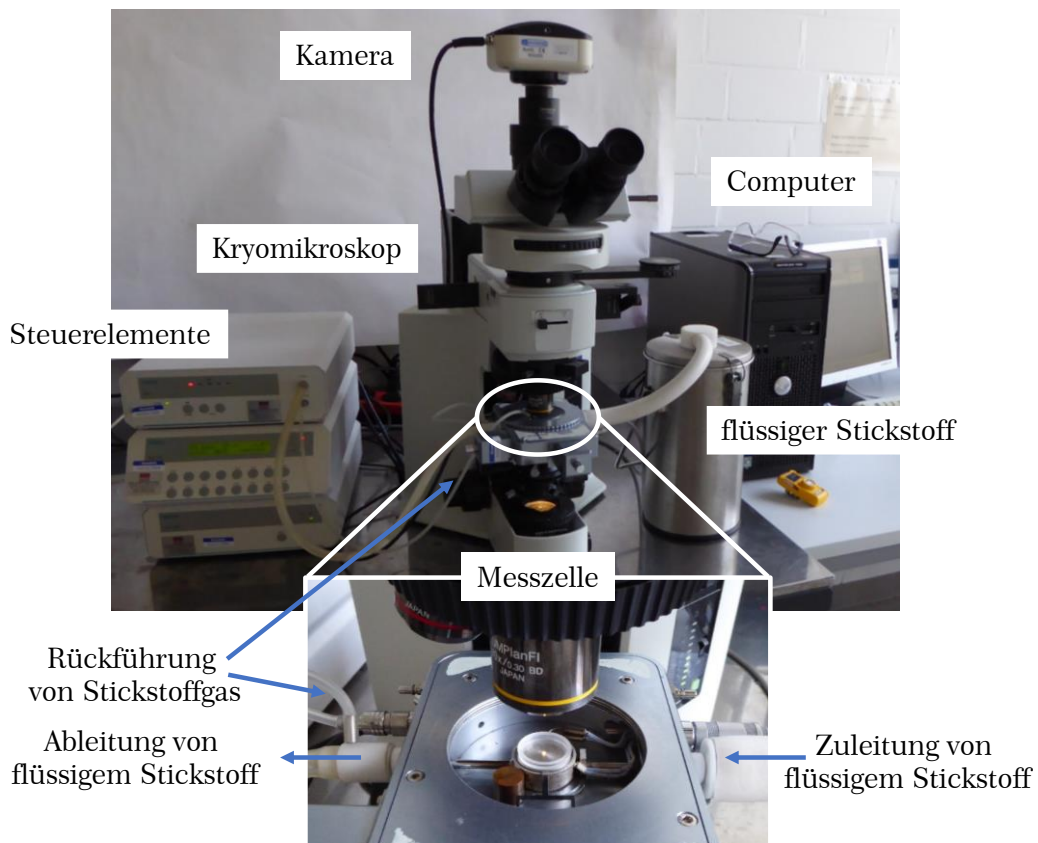


Abbildung 2.30: Aufbau des für zahlreiche Messmethoden zur Analyse der Antigefrieraktivität verwendeten Kryomikroskops, dessen Messzelle mit flüssigem Stickstoff gekühlt und mit dem entstehenden gasförmigen Stickstoff gespült wird. Die optische Erfassung der Ereignisse in der sich im Probentiegel auf dem Silberblock befindenden Probe erfolgt über eine computergesteuerte Kamera.

Die Temperatursteuerung mit einer Temperaturgenauigkeit von ± 0.1 °C und einstellbaren Raten von $\pm(0.01 - 150)$ °C min^{-1} erfolgt mit dem System TMS 94 (Linkam Scientific, 2018a). Der Silberblock mit einem Durchmesser von 22 mm und einer 1.3 mm- Apertur für die Messungen im Durchlichtmodus ist eine geeignete Plattform für einen Quarzglas-tiegel mit einem Innendurchmesser von 15 mm. Dieser wird von einem an einen X,Y-Motor gekoppelten Metallring umschlossen und ist somit über die Motorsteuerung MDS über 15 mm in jede Richtung beweglich. Dieser Ring kann über das angeschlossene Programm oder manuell über Drehschrauben an dem Kühltisch über den Silberblock gefahren werden. Dadurch lässt sich die sich zwischen zwei 14 mm-Deckgläsern (Paul Marienfeld GmbH & Co KG) befindende Probe nach geeigneten Stellen zur Untersuchung abrastern. Die Aufnahme der Bilder erfolgt im Gegenlicht mit einer senkrecht auf die Probe gerichteten Kamera (Q-Imaging MicroPublisher™ 5.0 RTV; ältere Messungen: PixelINK PL-A662). Bei einer 10-fachen Vergrößerung zum Beispiel wird ein Bildausschnitt von 1000 x 700 μm erfasst. Die Steuerung der Geräte erfolgt über entsprechende Computerprogramme, die in den einzelnen Kapiteln angeführt sind.

2.4.3. Eisstrukturierung

Zur Ermittlung der Eisstrukturierungseigenschaften potentieller eisbindender Moleküle wurde generell mit 10-facher Vergrößerung des Kryomikroskops (**Abschnitt 2.4.2**) gemessen. Zwischen 2-3 μl der Probe in einer 30 Gew%-igen wässrigen Sucrose-Lösung wurden auf eine runde Glasscheibe mit 14 mm Durchmesser pipettiert, die zur Abdichtung mit einem dünnen Silikonfettring am Rand versehen wurde (Budke, C. and Koop, T., 2006). Anschließend wurde die Probe mit einer zweiten Glasscheibe zu einem dünnen Film zusammengedrückt. Diese sogenannte **Sandwich-Probe** wird in einem Glastiegel mit 15 mm Durchmesser auf den Kühlblock der Kühleinheit des Kryomikroskops gelegt, sodass die Temperatur der Probe kontrolliert geändert werden konnte. Zunächst wurde die Probe mit einer erhöhten Rate von $-30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ auf minimal $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, wodurch ein polykristalliner Eisfilm entstand. Durch anfängliches schnelleres Aufwärmen auf eine Temperatur wenige Grad unterhalb des Schmelzpunktes und darauffolgende kontinuierliche Herabsetzung der Heizrate bei Annäherung an den Schmelzpunkt wurde der Eisfilm bis auf wenige einzelne Eiskristalle angeschmolzen. Bei abwechselndem Abkühlen und Aufwärmen mit $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $\pm 0.05\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ oder $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ verblieb idealerweise ein einzelner Kristall im Fokus des Betrachters. Dieser Kristall wurde zunächst auf eine Größe von maximal 20 μm und eine möglichst runde Form angeschmolzen und anschließend mit der kleinsten möglichen Rate von $-0.01\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ kontinuierlich abgekühlt. Abgebrochen wurde der Kühlprozess, wenn der Kristall eine Größe von etwa 150 μm erreichte, spätestens nach einer Kühlzeit von 30 min. Während des Kühlens wurden alle 6 s automatisch durch die Computersteuerung Bilder mit der Kamera aufgenommen.

Bei früheren Messungen wurde zur Steuerung der Temperatur und des X,Y-Motors sowie der Aufnahme der Bilder das zu der Linkam-Kontrolleinheit gehörende Programm **Linksys32** verwendet. Da die Verwendung dieses Programms zuletzt mit oftmaligen Kamera-, Programm- oder gar Computerabstürzen verbunden war, wurde ein auf **LabView™** basierendes, stabil laufendes Programm von C. Budke eingerichtet (**TH_2017_Okt**).

Wichtig zu beachten ist bei den Eisstrukturierungsmessungen, dass beim Abkühlen keine zu hohe Kühlrate verwendet wird, da bei dem daraus folgenden dendritischen Wachstum der Kristall eine Strukturierung erhalten würde, die nicht im Zusammenhang mit adsorbierenden Molekülen steht. Die Geschwindigkeit des Kristallwachstums wird zudem auch durch die Temperaturdifferenz zum Schmelzpunkt und die Viskosität der Lösung bestimmt. Eine hohe Viskosität fördert dendritisches Wachstum, weshalb als grober Richtwert der Schmelzpunkt der Lösung nicht niedriger als $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sein sollte. Der Schmelzpunkt steht allerdings nicht in direkter Korrelation mit der Viskosität, sondern ist von dem Medium abhängig. Generell ist eine entsprechende Referenzmessung mit dem reinen Medium, das dieselbe Schmelztemperatur aufweist, als direkter Vergleich empfehlenswert.

2.4.4. Eisrekristallisationsinhibierung (IRI)

Zur Analyse der eisrekristallisationsinhibierenden Eigenschaften von Molekülen wurde das 20x-Objektiv des Kryomikroskops (**Abschnitt 2.4.2**) genutzt. Die Proben wurden als wässrige Lösungen mit 45 Gew% Sucrose angesetzt. Hierbei wurden 1.5 μl bis maximal 2 μl der Probe zwischen zwei Glasscheiben mit 14 mm Durchmesser zusammengepresst, sodass sich ein sehr dünner Probenfilm über den gesamten Bereich zwischen den Glasscheiben ausbildete. Überschüssige und an den Rändern austretende Lösung wurde mit einem Tuch abgenommen. Die auf diese Weise präparierte Sandwich-Probe wurde in einen 15 mm-Glastiegel gelegt und mit dem Kryomikroskop gekühlt und beobachtet. Die Probe wurde zunächst mit einer Rate von $-20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ bis $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, um einen polykristallinen Eisfilm mit kleinen Eiskristallen zu erhalten. Anschließend wurde mit einer konstanten Rate von $+10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ auf $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgewärmt und diese Temperatur 120 min gehalten (s. **Tabelle 2.5**). Während der Haltezeit wurden alle 15 s Kamerabilder aufgenommen, die simultan von dem Messprogramm u.a. bezüglich der Kristallradien und des Eisanteils in Abhängigkeit von der Zeit ausgewertet wurden (s. dazu auch **Abschnitt 2.4.4.1**).

Tabelle 2.5: Temperaturrempe für die IRRINA-Messungen. Bei $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird die Temperatur 120 min konstant gehalten und das Rekristallisationsverhalten beobachtet.

Endtemperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Rate [$^{\circ}\text{C min}^{-1}$]	Haltezeit [min]
-50	20	--
-8	10	120
10	10	--

Durch das Fehlen eines abdichtenden Silikonfettrandes wird ein sehr dünner Probenfilm erhalten, der einen polykristallinen Eisfilm in nur einer horizontalen Ebene bildet, was für diese Messungen vorteilhaft ist. Nachteilig erweist sich dabei die Möglichkeit des Verdampfens von Wasser am Rand des Films. Die Aufkonzentration der Lösung am Rand führt zu einer Erniedrigung der Schmelztemperatur in diesem Bereich, was durch die Änderung im Eisanteil über die gesamte Messzeit von 120 min die Ergebnisse beeinflussen kann. Bei den Messungen ist daher darauf zu achten, das Probenvolumen nicht zu klein zu wählen (mind. 1 μl), um einen möglichst großen Film vorliegen zu haben und einen Bildausschnitt in der Mitte des Probenfilmes auswählen zu können, in dem eine Beeinflussung durch Verdampfung ausgeschlossen werden kann. Für die Generierung eines polykristallinen Eisfilms mit einem sich als am besten geeignet herausgestellten Eisanteil Q_v von etwa 0.10 ± 0.02 hat sich eine 45 Gew%-ige Sucroslösung bei einer Messtemperatur von $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ bewährt (Budke et al., 2009). Bei zu kleinen Eisanteilen wird die Streuung zwischen einzelnen Messungen größer, da statistische Ungenauigkeiten entweder durch eine geringe Kristallanzahl oder eine breitere Verteilung an Abständen der Kristalle zueinander hinzukommen. Dagegen hätte ein zu großer Eisanteil eine Agglomeration mehrerer Kristalle besonders nach längerer Rekristallisationszeit zur Folge, wodurch die Kristallerkennung fehlerhaft wird.

2.4.4.1 Datenauswertung

Die Steuerung der Kühleinheit und der Kamera erfolgt über ein von C. Budke eingerichtetes LabView™-Programm (Rek_2017_Aug), mit dem ebenso der X,Y-Motor zur Bewegung des Glastiegels verbunden ist. Zu jedem aufgenommenen Bild zu der voreingestellten Zeit werden durch automatische Erkennung sämtliche nützliche Informationen für die Auswertung wie die Kristallradien r , die Anzahl an Kristallen N und der Eisanteil Q in Abhängigkeit von der Zeit t bestimmt und die Daten in eine Textdatei geschrieben. Mithilfe des Origin-gestützten Datenanalyse-Programms Recrystallization_2016_Okt (Engdahl, 2015) werden die Ratenkonstanten k_d für den diffusionskontrollierten und k_i für den wachstumsinhibierten Prozess durch Anpassung mit der Funktion Ostwaldreifung erhalten. Diese setzt sich aus der **Gleichung (2.35)** (lineare Anpassung bei vollständiger Diffusionskontrolle oder vollständiger Wachstumsinhibierung) bzw. den **Gleichungen (2.38)** und **(2.39)** (doppelt-lineares Verhalten bei moderaten Konzentrationen an Antiegefriersubstanzen) zusammen (**Abbildung 2.31**).

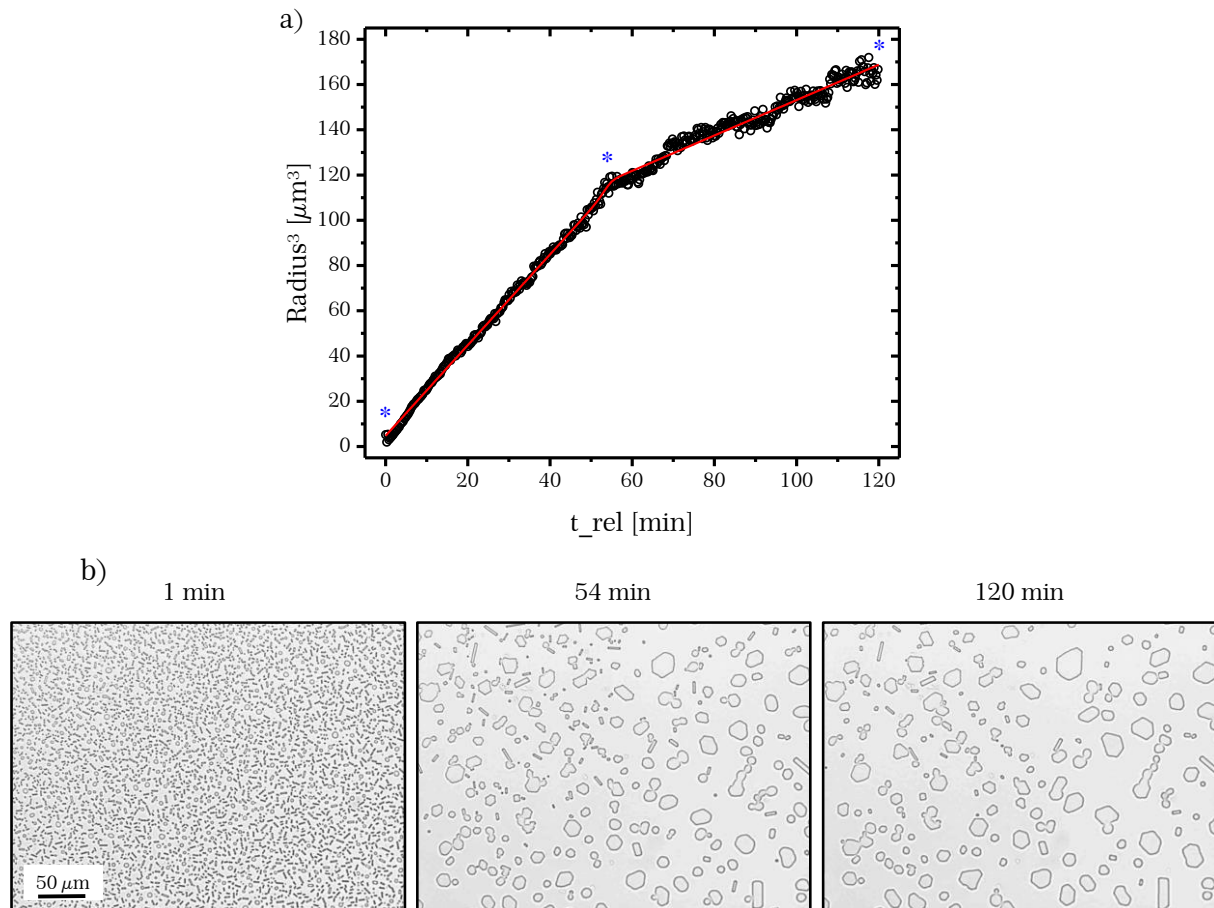


Abbildung 2.31: Zeitliche Änderung der bei IRI-Messungen ausgegebenen Parameter am Beispiel einer 45 Gew.-%-igen Sucroselösung mit $4.3 \mu\text{M}$ TmAFP. a) Der kubische mittlere Radius r^3 nimmt sowohl für den diffusionskontrollierten Prozess bis 54 min als auch bei der nachfolgenden Wachstumsinhibierung linear zu. Nach Eingabe des Befehls zur doppelt-linearen Anpassung werden die Geraden als rote Linie in der Graphik dargestellt. b) Aus den aufgenommenen Bildern des Eisfilms werden die Radien der Kristalle zu den entsprechenden Zeitpunkten ermittelt. Dargestellt sind hier die Bilder zu den in a) markierten Zeiten.

Bei älteren Messungen (Birkenpollen) wurde statt des auf LabView™ basierenden Programms die frei verfügbare Bildauswertungssoftware UTHSCSA Image Tool 3.0 eingesetzt und als Analyseprogramm zur Bestimmung der Ratenkonstanten auf Igor Pro zurückgegriffen (Budke, 2010). Es ist anzunehmen, dass die Kristallgrößenerkennungen in den beiden Programmen etwas andere Ergebnisse liefern, wie im **Anhang A.2** genauer erläutert wird.

Die Auflösung der Bilder wurde im Verlauf der Messung über 120 min geringer, d.h. die Kristalle wurden unschärfer abgebildet. Vermutet wurde ein Herausbewegen der Probe aus dem zuvor eingestellten Fokus durch ein minimales Absenken des Mikroskoptisches, auf dem sich die Kühleinheit befindet. Das führte bei den Messungen mit hoher Konzentration an eisrekristallisationsinhibierenden Molekülen, gleichbedeutend mit einer gleichbleibend hohen Anzahl an kleinen Eiskristallen, zu einer über die Zeit schwieriger werdenden Erkennung der Kristalle. Dieses äußerte sich in einem starken Anstieg des vom Programm ermittelten Eisanteils Q_v und daraus folgend der Kristallradien, die nach etwa 20-60 min einen Endwert erreichten und danach näherungsweise konstant blieben. Die Auswertung der Ratenkonstanten erfolgte in diesen Fällen erst ab dem Zeitpunkt, an dem die Änderung des Eisanteils bis zum Ende der Messung unterhalb des festgesetzten Grenzwertes von $\Delta Q < 0.02$ lag. Der angegebene Eisanteil entsprach dann allerdings wegen der fehlerhaften Erkennung nicht dem tatsächlichen.

Die Erkennung der einzelnen Kristalle wäre aufgrund ihrer sehr geringen Größe auch bei guter Bildauflösung fehlerbehaftet gewesen, sodass auch in jenem Fall die Ergebnisse bezüglich der Kristallradien mit größeren Fehlern behaftet gewesen wären. Da die erhaltenen Ratenkonstanten im Bereich von $10^{-3} - 10^{-2} \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ liegen, hat eine Abweichung in derselben Größenordnung eine zu vernachlässigende Auswirkung auf die Auswertung bezüglich der effektiven Konzentration c_i .

2.4.4.2 Bildanalyse

Die Analyse der aufgenommenen Bilder zur Ermittlung der Kristallradien und der Anzahl an Kristallen erfolgt sowohl mit der Software Image Tool als auch mit dem LabVIEW™-Programm **Rek_2017_Aug** nach dem gleichen Prinzip (Budke, 2018).

Zunächst wird das Bild bezüglich der Länge kalibriert, indem die Pixel mit der eingegebenen Vergrößerung des Mikroskops verrechnet werden. Ein Pixel im Bild entspricht dabei einer Länge von $(3.38/\text{Vergrößerung})$ in Mikrometern. Das Analyseprogramm ermittelt von den erkannten Objekten jeweils über die Anzahl an Pixeln den Umfang und daraus den Durchmesser eines hypothetischen perfekten Kreises, wobei die **Dark Objects**, die den gesamten Kristall als ausgefülltes Objekt darstellen, einen Außendurchmesser liefern, während der Durchmesser der **Bright Objects** dem Innendurchmesser des Kristalls entspricht, indem diese als offene Objekte mit Umrandung dargestellt werden. Der mittlere Durchmesser ergibt sich

nun aus den Mittelwerten aller Außen- und den Mittelwerten aller Innendurchmesser.

mittlerer Durchmesser =

$$\frac{\text{Mittelwert der Außendurchmesser} + \text{Mittelwert der Innendurchmesser}}{2} \quad (2.42)$$

Der ausgegebene und für die IRRINA-Auswertung benötigte Wert r^3 gibt den kubischen mittleren Radius an.

Die Gesamtzahl N an Kristallen errechnet sich über die mittlere Anzahl der **Dark** und **Bright Objects**.

$$N = \frac{N(\text{außen}) + N(\text{innen})}{2} \quad (2.43)$$

Unter der Annahme einer zylindrischen Form der Kristalle zwischen den beiden Deckgläsern wird der Eisanteil Q bestimmt aus dem Produkt der mittleren Fläche \bar{A} der Kristalle und der Kristallanzahl N , dividiert durch die Gesamtfläche A_{ges} des Bildausschnittes.

$$Q = \frac{\bar{A} \cdot N}{A_{\text{ges}}} \quad (2.44)$$

Alle nicht vollständig erkannten Kreise werden durch das Programm geschlossen und die sich im Bildrand befindenden Objekte aus der Auswertung entfernt. Kleine vereinzelte Pixel werden bereinigt. Werden Kristalle trotz der nachträglichen Korrektur nicht als geschlossene Objekte erkannt, werden für diese lediglich ausgefüllte Objekte und damit Außendurchmesser ausgegeben. Daraus ergibt sich eine Verfälschung des Mittelwertes, da mehr Kristalle zu den Außendurchmessern als zu den Innendurchmessern beitragen.

Solange die Kristalle sehr klein sind, fehlen die Innendurchmesser vieler Kristalle, die aber kaum von Null verschieden sind, weshalb dieser Umstand eine vernachlässigbare Auswirkung auf den mittleren Radius und die Ratenkonstante hat. Mit fortschreitendem Wachsen der Kristalle wird die Erkennung dieser durch das Programm besser und im besten Fall jeder Kristall als vollständiges Objekt erkannt. Daher sind hauptsächlich die ersten Minuten einer Messung von einer möglichen falschen Auswertung der Kristallradien betroffen.

2.4.5. Thermische Hysterese (TH)

Zur Bestimmung der Thermischen Hystereseaktivität von antigefrieraktiven Molekülen sind bisher zahlreiche experimentelle Methoden entwickelt worden. Sie beruhen einerseits auf optischer Detektion an einem Nanoliter-Osmometer (Scotter et al., 2006; Bar et al., 2008; Bar-Dolev et al., 2012; Braslavsky and Drori, 2013; Oude Vrielink et al., 2016) oder in einem Mikrofluidik-Chip (Drori et al., 2014; Drori et al., 2015b) bzw. in einer Kapillare (Takamichi et al., 2007). Andererseits kann der Gefrierprozess am Hysteresegefrierpunkt auch mittels Sonokristallisation (Olijve et al., 2016b) oder Wärmestromkalorimetrie (Hansen, T. N. and Baust, J. G., 1988, 1989; Hansen et al., 1991; Lu et al., 2002; Inada, T. and Lu, S.-S., 2004; Ramlöv et al., 2005; Yu et al., 2010) thermisch erfasst werden.

In dieser Arbeit wurden erstmals in der Arbeitsgruppe Experimente zur Erfassung der Thermischen Hysterese durchgeführt. Dazu wurden zwei experimentelle Methoden auf ihre Anwendbarkeit getestet und durch zahlreiche Variationen bezüglich der Probenpräparation und Temperaturrampe verbessert. Angelehnt an die Messprozedur am Nanoliter-Osmometer (Bar et al., 2008; Braslavsky and Drori, 2013) wurde eine Messmethode am Kryomikroskop entwickelt, wobei die Kristallexplosion optisch verfolgt werden und durch Aufnahme von Bildern als Video präsentiert werden kann. Da die Hysterese stark abhängig von Parametern wie Anfangsgröße des Kristalls, Haltezeit oder Kühlrate ist (Takamichi et al., 2007), ist besonders darauf zu achten, die Messungen zum besseren Vergleich untereinander reproduzierbar durchführen zu können. Als zweite Methode wurde sich besonders an den in Ramlöv et al. (2005) beschriebenen Wärmestromkalorimetrie-Experimenten orientiert und eine eigene Temperaturrampe für die DSC-TH-Messungen erarbeitet (s. **Anhang A.3**).

2.4.5.1 Optische TH-Bestimmung am Kryomikroskop

Für die optische Untersuchung der Thermischen Hysterese wird das in **Abschnitt 2.4.2** beschriebene Kryomikroskop verwendet. Es werden für die Messungen die 50x- und 100x-Objektive zur Vergrößerung verwendet, um den Kristall gut beobachten zu können und den ganzen Emulsionstropfen im Blick zu haben. Zur Temperatur- und Bewegungssteuerung wird das LabVIEW™-basierte Programm TH_2017_Okt genutzt. Verändert werden kann während eines laufenden Experiments die Aufnahmezeit der Bilder, wobei maximal 1 Bild pro Sekunde gespeichert werden kann. Für die Beobachtung der Thermischen Hysterese unter dem Mikroskop wird ein einzelner Kristall mit einer Größe von etwa 10 μm benötigt, der sich in einem um 100 bis 200 μm großen Wassertropfen in einer Ölmatrix generieren lässt (Braslavsky and Drori, 2013). Eine virtuelle Größenskala in dem im Programm angezeigten Bild gibt eine Orientierung über die Kristall- und Wassertropfengröße.

Probenpräparation

Es wurden zwei Methoden angewandt zur Generierung einer inversen Emulsion, die ohne Verwendung eines Emulgators auskommt (Nickel, 2013). Diese Emulsion ist auf dem Probenträger während der gesamten Messzeit stabil.

a) 4 μl der wässrigen Probe werden zu 396 μl Squalen in ein 500 μl -Eppendorfgefäß gegeben und dieses per Hand kurz geschüttelt, sodass eine Wasser-in-Öl-Emulsion entsteht (**Abbildung 2.32**). Von dieser nur kurzzeitig (< 5 min) stabilen Emulsion werden dann 5 μl entnommen und auf eine Glasscheibe mit 14 mm Durchmesser, die sich in einem 15 mm-Glastiegel befindet, pipettiert.

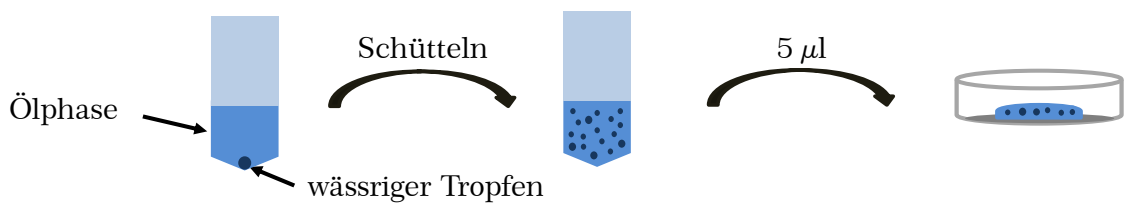


Abbildung 2.32: Schematische Darstellung der Präparation der inversen Emulsion für TH-Messungen über manuelles Mischen der wässrigen und organischen Phase.

b) Ein 10 μl großer Tropfen Squalen wird auf eine 14 mm-Glasscheibe pipettiert, welche in einem Glastiegel mit 15 mm Durchmesser liegt. Die wässrige Probe wird mit einer Glaskapillare (**BRAND**) entnommen und diese wiederholt in den Squalentropfen eingetaucht, wodurch darin Wassertröpfchen entstehen.

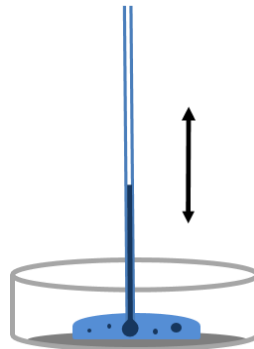


Abbildung 2.33: Eine Möglichkeit 100 μm große Wassertropfen in einer Ölphase herzustellen durch wiederholtes Eintauchen einer Kapillare, die mit der wässrigen Lösung gefüllt ist.

Der Glastiegel mit der Probenemulsion wird anschließend in die Kühleinheit des Kryomikroskops platziert. Bei beiden Präparationsmethoden werden Wassertropfen mit einer polydispersen Größenverteilung erhalten (s. **Abbildung 2.34**), von denen unter dem Mikroskop ein etwa 100 μm großer Tropfen ausgewählt wird. Anschließend wird die Probe einem im folgenden Abschnitt **Messprozedur** beschriebenen Temperaturprogramm ausgesetzt.

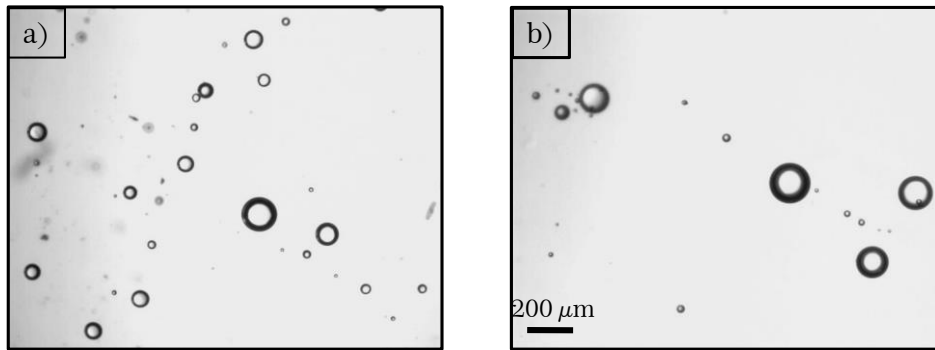


Abbildung 2.34: Lichtmikroskopische Aufnahmen der inversen Emulsionen von wässrigen Lösungströpfchen in Squalen. a) Präparation über Schütteln eines Wasser-Öl-Gemisches (Methode a)) ergibt eine breitere Tropfengrößenverteilung mit vielen kleinen Kristallen als die Kapillarmethode b). Für die TH-Messungen werden Tropfen mit einer Größe von 100-200 μm ausgewählt.

Die Methode a) hat sich weniger bewährt, da bei den Experimenten mit dem MBP-TmAFP in dem Puffer PBS eine Denaturierung des Proteins unmittelbar nach der Herstellung der Emulsion beobachtet worden war. Bei den Messungen, bei denen die Methode b) zur Tropfengenerierung angewandt worden war, wurde ein Ausfallen des Proteins nicht immer beobachtet, was in [Kapitel 3.3.2](#) Gegenstand der Diskussion ist.

Messprozedur

Das folgend beschriebene Temperaturprofil ermöglicht das Erhalten eines kleinen, etwa 10 μm großen Kristalls in dem wässrigen Tropfen. Die Emulsionsprobe wird mit einer Rate von $-30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ auf minimal $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt, sodass der beobachtete Tropfen vollständig durchgefroren ist. Zunächst schnelleres Aufwärmen auf eine Temperatur unterhalb des Schmelzpunktes führt zu einem Anschmelzen des Eises in dem Tropfen. Durch stufenweise Herabsetzung der Heizrate bei Temperaturen knapp unterhalb des Schmelzpunktes schmilzt das Eis bis auf wenige einzelne Eiskristalle, von denen durch abwechselndes Abkühlen und Aufwärmen mit Raten von $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $\pm 0.05\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und $\pm 0.01\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ein einzelner Kristall in dem Tropfen verbleibt. Dieser Kristall sollte möglichst auf eine Größe von 10 μm gebracht werden. Aufgrund der für diese Zwecke mäßigen Temperaturgenauigkeit von $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ist dieses Vorhaben schwierig zu steuern, was zu einem plötzlichen, vollständigen Wegschmelzen des Kristalls führen kann. Deshalb wird in vielen Messungen ein größerer Kristall ($\sim 15\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$), zum Teil mit sichtbaren Luftporen, als Startkristall für die Untersuchung der Thermischen Hysterese verwendet. Ist der Kristall mit der passenden Größe stabilisiert, wird dieser solange abgekühlt, bis der Kristall explodiert und der Tropfen gefroren ist.

Es wurden hierbei zwei unterschiedliche Temperaturrampen ausgetestet, die im Folgenden aufgeführt werden und in [Abbildung 2.35](#) schematisch dargestellt sind.

i) Mit einer Kühlrate von -0.1 °C min^{-1} wird von der Starttemperatur, die in den meisten Fällen der Schmelztemperatur entspricht, kontinuierlich abgekühlt. Für die Auswertung ist zu beachten, dass der Schmelzpunkt nur mit einer Ungenauigkeit von $\pm 0.1 \text{ °C}$ oder in manchen Fällen sogar $\pm 0.2 \text{ °C}$ bestimmt werden kann. Um den Kristall anfangs stabil zu halten, kann es notwendig sein, als Starttemperatur die niedrigere der beiden als Schmelzpunkt bestimmten Temperaturen zu wählen und von diesem Punkt aus den Kühlprozess zu starten.

ii) Zunächst wird der Kristall 0.2 °C oder 0.3 °C unterhalb des Schmelzpunktes abgekühlt, damit dieser während der folgenden Halteperiode von 10 min bei dieser Temperatur nicht wegschmilzt. Anschließend wird mit einer konstanten Rate von -0.1 °C min^{-1} abgekühlt und alle 0.1 °C für 10 s oder 30 s die Temperatur gehalten. Diese Methode eignet sich daher nicht für Lösungen mit einer TH-Aktivität kleiner als 0.3 °C .

Die Messmethode ii) ist noch weiter bezüglich der Hysterese optimierbar, indem zum Beispiel längere Haltezeiten besonders während der Kühlphase vorgegeben werden. Eine kleinere Kühlrate von $-0.05 \text{ °C min}^{-1}$ ergab bei Testmessungen keinen detektierbaren Unterschied in den TH-Werten und wurde aufgrund der höheren Messlaufzeit durch die höhere Rate von -0.1 °C min^{-1} ersetzt.

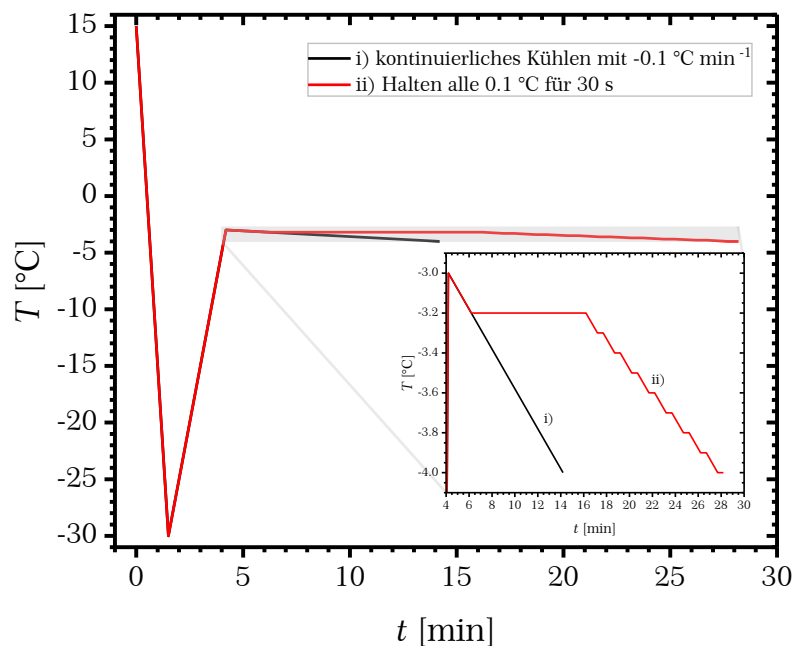


Abbildung 2.35: Temperaturprofile der beiden ausgearbeiteten Messmethoden zur Bestimmung der Thermischen Hystereseaktivität am Kryomikroskop. Die eingeklinkte Graphik zeigt den sich unterscheidenden Ausschnitt der Abkühlprozeduren des angeschmolzenen Kristalls mit $\sim 15 \text{ mm}$ Größe. i) kontinuierliches Abkühlen (schwarze Linie). ii) stufenweises Herabsetzen der Temperatur mit anfänglich 10-minütiger und anschließend 30-sekündigen Halteperioden.

Bildaufnahme

Der Hysteresegefrierpunkt kann durch Aufnahme von Bildern nachträglich erfasst werden. Dabei ist bei einer Kühlrate von -0.1 °C min^{-1} eine Aufnahme von mindestens 1 Bild pro Minute notwendig, um die Temperatur der Kristallexplosion mit einer Genauigkeit von $\pm 0.1 \text{ °C}$ ermitteln zu können. Wegen der Temperaturungenauigkeit von $\pm 0.1 \text{ °C}$ ist diese Aufnahmerate ausreichend. Um anschließend die aufgenommenen Bilder und den Prozess des Explodierens des Kristalls anhand eines Videos veranschaulichen zu können, sollte die maximal mögliche Aufnahmerate von einem Bild pro Sekunde eingestellt werden. Ist die Hysteresetemperatur einer Lösung durch eine vorherige Messung bekannt, kann diese Aufnahmerate auch erst im Temperaturbereich des Gefrierereignisses hochgesetzt werden. Dabei sollte aufgrund der statistischen Schwankungen in der Hysteresetemperatur spätestens bei einer Temperatur von 0.3 °C oberhalb der zuvor ermittelten Temperatur die Rate geändert werden. Alternativ kann die Bildaufnahmerate während der gesamten Messzeit auf 1 Bild pro Sekunde eingestellt werden und anschließend können die nicht benötigten Bilder gelöscht werden, um Speicherplatz auf dem Rechner zu sparen.

Die Temperaturschwankung der Kühleinheit von $\pm 0.1 \text{ °C}$ ermöglicht generell lediglich die Erfassung von Thermischen Hysteresen größer als 0.1 °C , was die Untersuchung gering konzentrierter Proben oder nur wenig aktiver, moderater Antigefrier-moleküle ausschließt. Hyperaktive Antigefriersubstanzen können mit dem hier verwendeten Kryomikroskop gut analysiert werden. Zwei weitere, zuvor schon angesprochene Nachteile ergeben sich aus der geringen Temperatursensitivität im Vergleich zum Nanoliter-Osmometer ($\pm 0.002 \text{ °C}$) (Braslavsky and Drori, 2013). Kleine Kristalle können sehr schnell wegschmelzen, obwohl der Kühlmodus mit einer geringen Rate eingestellt ist, wenn die aktuelle Temperatur zu nahe am Schmelzpunkt liegt. Aus demselben Grund ist die genaue Erfassung der Schmelz- und Gefriertemperaturen mit einem Fehler behaftet, sodass die daraus berechnete Hysteresetemperatur, die sich aus deren Differenz berechnet, eine Ungenauigkeit von $\pm 0.14 \text{ °C}$ hat.

2.5. Spektroskopie an Biomolekülen

Mithilfe spektroskopischer Methoden wie die **IR-Spektroskopie** oder die **UV-VIS-Spektroskopie** lassen sich Informationen über die chemische Struktur einer Probe bzw. eines einzelnen Moleküls einholen. Während die UV-VIS-Spektroskopie lediglich über die Zugehörigkeit zu der Substanzklasse der Farbstoffe, Proteine oder DNA Auskunft gibt, lässt die IR-Spektroskopie Aussagen über bestimmte funktionelle Gruppen im Molekül zu und kann somit zur Strukturaufklärung beitragen. Eine wichtige Anwendung der UV-VIS-Spektroskopie, wofür sie auch in dieser Arbeit eingesetzt wird, ist die Konzentrationsbestimmung der Probe über das spezifische Absorptionsmaximum. Die IR-Spektroskopie wird zur Identifizierung der Molekülklasse über das Bandenmuster im sogenannten **fingerprint**-Bereich unterhalb von 1500 cm^{-1} angewendet. Die folgenden **Abschnitte 2.5.1** und **2.5.2** geben einen Überblick über die Spektroskopiemethoden im Allgemeinen und die hier in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Messeinstellungen im Besonderen.

2.5.1. ATR-FTIR-Spektroskopie

Bei der **IR-Spektroskopie** (IR: Infrarot) werden die charakteristischen Schwingungen und auch Rotationen der funktionellen Gruppen eines Moleküls zur Strukturaufklärung herangezogen. Die IR-Strahlung liegt auf der niederenergetischen Seite des elektromagnetischen Spektrums im Bereich zwischen etwa 750 nm und 1 mm (Atkins and Paula, 2006) und wird im Absorptionsspektrum mit dem Formelzeichen Wellenzahl $\tilde{\nu}$ in inversen Zentimetern (cm^{-1}) angegeben. Die Wellenzahl ist antiproportional zur Wellenlänge λ und somit proportional zur Energie E . Dabei sind h die Plancksche Konstante, c die Lichtgeschwindigkeit im Vakuum und ν die Frequenz.

$$E = h\nu = hc\lambda^{-1} = hc\tilde{\nu} \quad (2.45)$$

Schwingungsbanden von Molekülen in der Gasphase weisen eine Rotationsfeinstruktur auf, die in Lösung aufgrund der Lebensdauer- und Dopplerverbreiterung in breite, undifferenzierte Banden verschmiert (Atkins and Paula, 2006). Das Absorptionsspektrum liefert Informationen über den strukturellen Aufbau des untersuchten Moleküls, da die Schwingungsfrequenzen spezifisch für eine bestimmte funktionelle Gruppe sind. Dabei gilt nach dem vereinfachten Modell des harmonischen Oszillators eine Proportionalität der Schwingungsfrequenz ν_{vib} zu der Kraftkonstante k , die die Bindungsstärke zweier gegeneinander schwingender Atome ausdrückt, und eine entgegengesetzte Abhängigkeit von der Masse bzw. Trägheit der beteiligten Atome, die durch die reduzierte Masse $\mu = m_1m_2/(m_1+m_2)$ repräsentiert wird (Hesse et al., 2005).

$$\nu_{\text{vib}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2.46)$$

Es lässt sich beobachten, dass die Schwingungsfrequenz in der Reihe O-H > C-H > C-O > C-C aufgrund der schwächer werdenden Bindung abnimmt. Aufgrund der geringen Masse des H-Atoms finden dessen Schwingungen generell mit einer höheren Frequenz statt. Doppelbindungen besitzen aufgrund der höheren Bindungsstärke ebenso eine höhere Schwingungsfrequenz als Einfachbindungen.

Für die Energien E_{vib} der Schwingungsniveaus ergibt sich mit der Schwingungsquantenzahl $n = 0, 1, 2, 3, \dots$ folgende Gleichung.

$$E_{\text{vib}} = h\nu_{\text{vib}} \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (2.47)$$

Die spezielle Auswahlregel besagt, dass lediglich Übergänge mit $\Delta n = \pm 1$ möglich sind. Unter Absorption eines Photons geht das Molekül aus seinem Schwingungsgrundzustand n , der bei Raumtemperatur der Zustand mit $n = 0$ ist, in einen energetisch höher liegenden Zustand $n+1$ über, wodurch die entsprechende Schwingung angeregt wird. Die Energiedifferenzen $\Delta E_{\text{vib}} = h\nu_{\text{vib}}$ sind unabhängig von der Schwingungsquantenzahl äquidistant, wie die **Gleichung (2.47)** zeigt, sodass nur eine einzige Bande detektiert würde. Eine korrektere Beschreibung der Molekülschwingungen liefert das Modell des anharmonischen Oszillators, der zum Beispiel auch eine Dissoziation des Moleküls zulässt. Die Anharmonizität erlaubt zudem auch die weniger intensiven Oberschwingungen mit $\Delta n > \pm 1$. Da die Energieabstände mit steigender Quantenzahl n bzw. größerer Auslenkung aus der Gleichgewichtslage der Atome kleiner werden, bis bei großen Entfernungen der Atome das Molekül dissoziiert, sind im Spektrum mehrere Banden für die unterschiedlichen Übergänge sichtbar. Die harmonische Näherung erfasst diese Vorgänge allerdings nicht mehr, stellt jedoch für kleine Auslenkungen eine gute Beschreibung dar (Atkins and Paula, 2006).

Nach der allgemeinen Auswahlregel sind nur Schwingungen, die mit der Änderung des Dipolmoments im Molekül, einhergehen, infrarot-aktiv. Moleküle mit Symmetriezentrum sind nicht über IR-Spektroskopie analysierbar. Dazu bietet sich dann die Raman-Spektroskopie an.

Bei den sogenannten Normalschwingungen, die voneinander entkoppelt, d.h. unabhängig, angeregt werden können, lassen sich zwei Formen von Schwingungen unterscheiden. Die Valenz- oder auch Streckschwingungen gehen mit einer Änderung der Bindungslängen einher und werden in symmetrische und antisymmetrische Schwingungen unterschieden, während sich bei den Deformations- oder Biegeschwingungen die Bindungswinkel ändern bei nahezu konstant bleibendem Atomabstand (Atkins and Paula, 2006). Die Deformationsschwingungen werden weiter in **out of plane**-Schwingungen aus der Bindungsebene heraus und **in plane**-Schwingungen in der Schwingungsebene unterteilt (Hesse et al., 2005). Grundsätzlich sind die Valenzschwingungen höherfrequent als die Deformationsschwingungen. Diese Normalschwingungen werden begleitet von

unabhängigen Bewegungen weiterer Atome oder Atomgruppen. Daran sind schwere Atome generell weniger beteiligt als leichte Atome.

Ein IR-Spektrum lässt sich in den Bereich oberhalb von 1500 cm^{-1} , in dem den Schwingungsbanden einzelne funktionelle Gruppen zugeordnet werden können, und in den darunter liegenden sogenannten **fingerprint**-Bereich, der ein für das Molekül charakteristisches Bandenmuster zeigt, einteilen.

In dieser Arbeit werden Fourier-Transformations-Infrarot-Spektrometer (**FTIR**) eingesetzt, die im Gegensatz zu einem konventionellen Gitterspektrometer drei entscheidende Vorteile haben (Hesse et al., 2005). Es werden alle Frequenzen gleichzeitig erfasst, wodurch es bei der Messung zu einer erheblichen Zeitersparnis kommt (**Multiplex- oder Fellgett-Vorteil**) und die gesamte Lichtintensität zur Verfügung steht, was zudem das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert (**Jacquinot-Vorteil**). Der dritte Vorteil liegt in der hohen Frequenzgenauigkeit durch einen monochromatischen Laser als internen Standard (**Connes-Vorteil**). FT-IR-Spektrometer enthalten ein Michelson-Interferometer, das polychromatisches Licht durch einen Strahlteiler in zwei Teilstrahlen zerlegt, die durch einen feststehenden und einen beweglichen Spiegel zurück reflektiert und an dem Strahlteiler wieder kombiniert werden. Durch Interferenz dieser beiden Teilstrahlen ergibt sich ein Interferogramm, das die Intensität in Abhängigkeit von der Spiegelposition darstellt. Mathematische Operation (**Fouriertransformation**) wandelt dieses Interferogramm aus dem Orts- in den Wellenzahlraum um, d.h. in ein Bandenspektrum, welches die Intensität in Abhängigkeit von der Wellenzahl angibt.

2.5.1.1 ATR-Zelle

Die **ATR-Spektroskopie** (**ATR: Attenuated Total Reflection; abgeschwächte Totalreflexion**) stellt einen speziellen Messaufbau dar, der auf der Totalreflexion des von der Lichtquelle ausgesendeten Lichtstrahls an einer Grenzfläche beruht (Fahrenfort, 1961; Harrick, 1964). Der Strahl tritt durch einen Kristall mit hohem Brechungsindex n_1 (z. B. Diamant), der eine Grenzfläche mit der auf den Kristall aufgetragenen Probe mit niedrigerem Brechungsindex n_2 bildet, und wird aufgrund eines spezifischen Eintrittswinkels an dieser Grenzfläche total reflektiert. Die Lichtintensität ist entgegen der geometrischen Optik hinter der total reflektierenden Grenzfläche ungleich Null, es breitet sich eine sogenannte evaneszente Welle (lat. evanescere: verschwinden) in die Probe aus (**Abbildung 2.36**). Dabei handelt es sich um eine stehende Welle, deren Amplitude exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche abnimmt. Die Eindringtiefe d in das niedrigbrechende Medium, bei der die Amplitude des Lichts auf den Bruchteil $1/e$ gesunken ist, hängt direkt von der Wellenlänge des Lichts ab (Pedrotti et al., 2008) und liegt bei infrarotem Licht im Submikrometerbereich (Heberle and Ataka, 2004). Weitere Faktoren sind die Brechungsindizes n_1 und n_2 der beiden Medien sowie der Eintrittswinkel θ .

$$d = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - (n_2)^2}} \quad (2.48)$$

Das reflektierte Licht besitzt eine um die Absorption durch die Probe geringere Intensität, sodass ein Absorptionsspektrum mit dem für die Probe charakteristischen Absorptionsmuster erhalten wird. Es erfolgt in dieser Arbeit eine einfache Korrektur der gemessenen Spektren, die die Wellenlängenabhängigkeit der Eindringtiefe berücksichtigt, indem die gemessene Absorbanz durch die Wellenzahl dividiert wird. Dieses ermöglicht u.a. einen besseren Vergleich mit klassischen Transmissionsspektren.

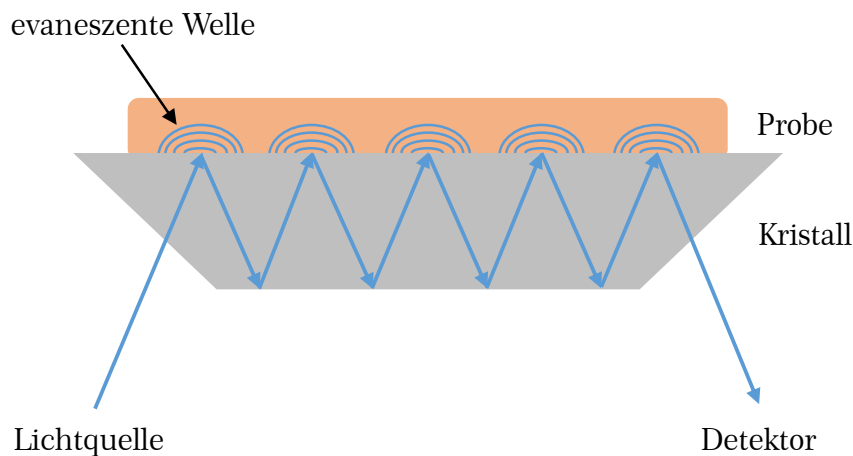


Abbildung 2.36: Skizze des Aufbaus eines ATR-Experiments. Der von der Lichtquelle ausgesendete Lichtstrahl wird an der Grenzfläche Kristall-Probe total reflektiert, sodass eine evaneszente Welle, hier nach dem Huygensschen Modell als Kugelwellen dargestellt, in die Probe eindringt. Durch Absorption empfängt der Detektor eine verminderte Lichtintensität, wodurch ein klassisches Bandenspektrum erhalten wird.

Da die Dicke der Probe die Eindringtiefe um ein Vielfaches übersteigt, haben Probe und Referenz immer dieselbe Pfadlänge, was ein Vorteil dieser Methode verglichen mit der Sandwich-Methode bei der klassischen Transmissions-IR-Spektroskopie ist, bei der die flüssige Probe zwischen zwei nichtabsorbierende NaCl-Kristallscheiben gedrückt bzw. die kristalline Probe als Pressling vermessen wird. Außerdem können aus diesem Grund auch stark absorbierende Proben untersucht werden. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der ATR-Methode ist die Zugänglichkeit der Probe und die damit verbundene Möglichkeit der Variation verschiedener Messparameter wie Konzentration oder pH-Wert. In dieser Arbeit wird ausgenutzt, dass die anfangs in wässriger Lösung vorliegende Probe auf dem ATR-Kristall eingetrocknet werden kann, um das Lösungsmittel Wasser als störenden Hintergrund zu eliminieren. ATR-Kristalle mit mehrfachen Reflexionen an der Grenzfläche Kristall-Probe erhöhen zudem die gesamte Schichtdicke und damit die Sensitivität.

2.5.1.2 Messeinstellungen und Probenpräparation

In dieser Arbeit wurden zwei FTIR-Spektrometer (Bruker IFS 66v und IFS 66s) mit in den Strahlengang eingebauter ATR-Zelle mit neun aktiven Reflexionen (DuraSampleIRII, Smiths) oder einer Reflexion (Golden Gate-ATR-Einheit von Specac, LOT-QuantumDesign GmbH) eingesetzt (Abbildung 2.37). Beide ATR-Einheiten enthalten als hochbrechendes Probenträgermaterial einen Diamantkristall. Die Infrarotstrahlung wird in den Spektrometern von einem Global (Schwarzkörperstrahler aus Siliziumcarbid) als Lichtquelle ausgesendet. Die ATR-Zelle wurde jeweils zur Maximierung der vom Detektor als Counts pro Sekunde erfassten Lichtintensität mit Stellschrauben bezüglich der Ausrichtung im Strahlengang kalibriert. Als Detektor wurde ein Halbleiterdetektor (MCT: Mercury Cadmium Tellur) verwendet, der aufgrund seines Dunkelstroms mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) gekühlt wurde.

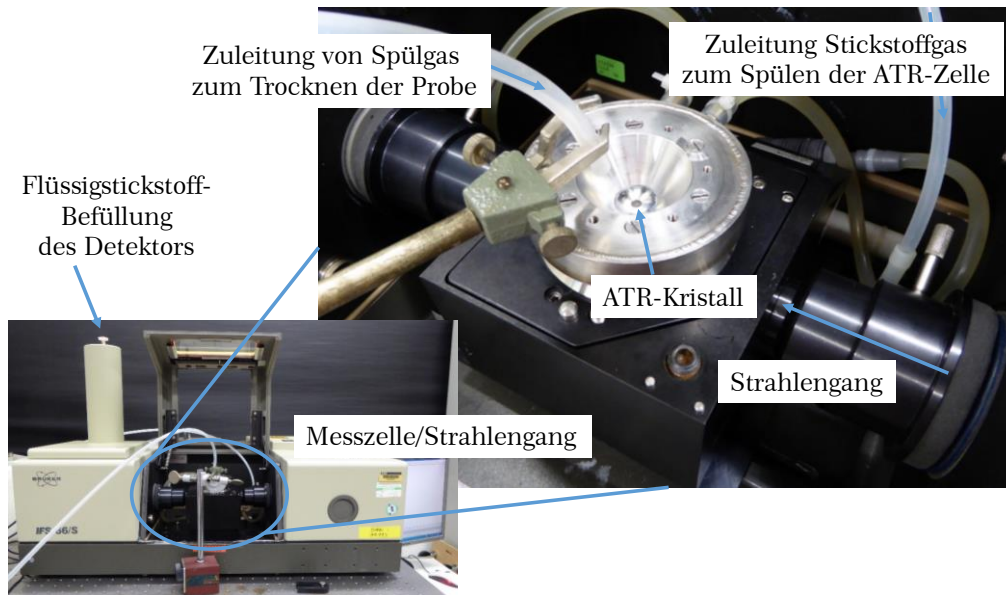


Abbildung 2.37: IR-Spektrometer mit in dem Strahlengang eingebauter ATR-Zelle (DuraSampleIRII; vergrößerte Darstellung rechts). Die Probe wird auf den ATR-Kristall aufgetragen und mithilfe des darauf gerichteten Schlauchs mit trockener Luft getrocknet. Die ATR-Zelle wird permanent mit Stickstoffgas durchströmt.

Der ATR-Kristall ist während der Messung leicht zugänglich und dementsprechend nicht abgeschlossen, sondern der Raumluft ausgesetzt. Nach längerem Spülen der Messzelle über mindestens 30 Minuten, um CO_2 und H_2O enthaltene Raumluft gegen IR-inaktives Stickstoffgas auszutauschen, wurden zunächst Testmessungen zur Kontrolle der Basislinie durchgeführt. Dazu wurden eine Hintergrundmessung und eine Probenmessung mit nicht beladenem ATR-Kristall gemacht. Waren im für Wasser(dampf) charakteristischen Bereich um 1650 cm^{-1} und 1350 cm^{-1} keine Rotations-schwingungsbanden mehr sichtbar, wurde mit den Messungen begonnen. Nach einer erneuten Referenzmessung mit Luft wurden anschließend 20-40 μl (DuraSampleIRII) bzw. 5-10 μl (Golden Gate) der wässrigen Probe auf den ATR-Kristall pipettiert und bei Raumtemperatur mit trockener Luft aus einem auf die Probe

gerichteten Schlauch eingetrocknet. Nach etwa 5 Minuten wurde ein Probenspektrum gemessen. War die Probe zu gering konzentriert, war aufgrund der geringen Absorbanz das Spektrum besonders durch die Rotationsbanden von verbliebenen Spuren von Wasser leicht verrauscht. Wenn ausreichend Probe verfügbar war, wurde weitere Probe auf den Kristall aufgetragen. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis ein Signal frei von Rotationsbanden des Wassers oder eine maximale Absorbanz von 1 erhalten wurde. Bei höheren Absorbanzen würde zu wenig Lichtintensität den Detektor erreichen und dieser somit an seine Empfindlichkeitsgrenze stoßen. Zur Überprüfung des Trocknungszustandes der Probe wurde 5 Minuten nach der ersten Messung ein zweites Spektrum aufgenommen. Wurde dabei keine Änderung in der Absorbanz einer im Spektrum bei 1650 cm^{-1} erscheinenden Schwingungsbande beobachtet, wurde die Probe als trocken angesehen und die Messung als abgeschlossen betrachtet. Mithilfe eines mit Wasser getränkten Tuches (**Kimtech Science, Kimberly-Clark® Professional**) wurde der ATR-Kristall gereinigt und mit der trockenen Luft getrocknet, bevor eine weitere Probe nach demselben Schema vermessen wurde. In **Tabelle 2.6** sind die typischen Messeinstellungen der im rapid-scan-Modus erfolgten Messungen dargelegt. Die Steuerung des Spektrometers erfolgte über die zugehörige Software **OPUS**.

Tabelle 2.6: Allgemeine Einstellungen für die Messungen an den FTIR-Spektrometern.

Apertur:	3.5 mm (1 mm; 4 mm)
Anzahl Scans Referenz und Probe:	1024 oder 512
Spiegelgeschwindigkeit:	150 kHz
Auflösung:	2 cm^{-1}
Verstärkung (gain):	1
Datenaufnahme:	$0\text{-}7000\text{ cm}^{-1}$; $\Delta\lambda \sim 1\text{ cm}^{-1}$
Datenspeicherung:	$4000\text{-}700\text{ cm}^{-1}$

Diese Einstellungen wurden während eines Forschungspraktikums als geeignet ausgearbeitet (Dreischmeier, 2012). Eine Erhöhung der Apertur hätte einerseits zwar eine erhöhte Lichtintensität zur Folge, was eine Untersuchung stärker absorbierender, höher konzentrierter Proben ermöglichen und somit ein geringeres Hintergrundsignal von Wasser bedeuten würde, führt jedoch auch zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis.

2.5.2. UV-VIS-Spektroskopie

Die **UV-VIS-Spektroskopie** beschäftigt sich mit der Anregung von Elektronen in Molekülen durch ultraviolettes (**UV**) Licht, das Wellenlängen von etwa 400 nm bis zu niedrigen Werten von 10 nm umfasst, und Licht aus dem sichtbaren Spektralbereich (**VIS**: Abkürzung für engl. **visible**; sichtbar), der von 400 nm bis etwa 750 nm reicht. Für die klassische UV-VIS-Spektroskopie wird üblicherweise der nahe UV-Bereich zwischen etwa 200 und 400 nm genutzt (Hesse et al., 2005). Eine besonders nützliche

Anwendung der UV-VIS-Spektroskopie ist die Konzentrationsbestimmung mithilfe der von Bouguer (1728), Lambert (1760) und Beer (1852) empirisch entwickelten Beziehung zwischen der Absorbanz A und der Konzentration c der Probe und der Schichtdicke d sowie einem weiteren Proportionalitätsfaktor ε . Diese Gleichung ist allgemein geläufig als **(Bouguer-)Lambert-Beer-Gesetz** und gilt für verdünnte Lösungen mit Konzentrationen $c < 0.01$ M.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2.49)$$

Die Absorbanz einer Probe sollte den Wert 1 nicht überschreiten, damit die transmittierte, den Detektor erreichende Lichtintensität I mehr als 10 % der Ausgangsintensität I_0 beträgt, d.h. die Transmission $T \geq 0.1$ ist, damit das Absorptionsspektrum nicht durch das Detektionslimit des Detektors verwaschen ist.

$$A = -\lg T = -\lg \left(\frac{I}{I_0} \right) \quad (2.50)$$

Der auch Extinktions- oder Absorptionskoeffizient genannte Proportionalitätsfaktor ε ist spezifisch für eine Substanz und für eine Wellenlänge, kann jedoch durch die Polarität des Lösungsmittels bzw. die molekulare Umgebung beeinflusst werden. Er gilt als Maß für die Wahrscheinlichkeit des Übergangs eines Elektrons aus seinem elektronischen Grundzustand S_0 in ein bestimmtes vibronisches und rotatorisches Niveau des elektronisch angeregten Zustandes S_1 , S_2 usw. Aufgrund der Drehimpulserhaltung sind nur solche Übergänge erlaubt, bei denen sich der Gesamtspin des Systems nicht ändert. Unter Berücksichtigung des Photospins von 1 sind demnach nur Übergänge zwischen Singulett- (S_x) bzw. Triplettzuständen (T_y) erlaubt (Atkins and Paula, 2006). Die einzelnen Spektrallinien der elektronischen und der begleitenden Vibrations- und Rotationsbanden verschmieren im UV-VIS-Absorptionsspektrum einer wässrigen Lösung zu einer breiten Bande aufgrund der Linienverbreiterung durch Herabsetzen der Lebensdauer der elektronischen Niveaus (Atkins and Paula, 2006).

Nach einem vereinfachten Molekülorbital (MO)-Modell lassen sich drei elektronische Übergänge benennen, die durch UV- oder sichtbares Licht angeregt werden können. Der energiereichste und damit bei kleineren Wellenlängen auftretende Übergang ist der $\sigma - \sigma^*$ -Übergang, der eine Anregung eines Elektrons aus einem bindenden in ein antibindendes Orbital bedeutet. Ein weiterer möglicher elektronischer Übergang ist der aus einem nichtbindenden Orbital (n) in ein antibindendes σ^* - oder π^* -Orbital. Die $n - \pi^*$ -Übergänge sowie die $\pi - \pi^*$ -Übergänge von konjugierten Systemen weisen die kleinsten Energien auf und können somit auch durch das energieärmere sichtbare Licht hervorgerufen werden (Hesse et al., 2005). Farbstoffe weisen in der Regel ein ausgedehntes konjugiertes π -System auf.

Als Absorptionsmaximum, das ein Charakteristikum für eine Substanz ist, wird die Wellenlänge λ_{\max} mit dem höchsten Wert für ε bzw. der höchsten Absorbanz

bezeichnet. Farbstoffe etwa absorbieren in einem spezifischen Wellenlängenbereich im sichtbaren Spektralbereich und erscheinen dem menschlichen Auge in der entsprechenden Komplementärfarbe. Die Farbe einer Substanz lässt daher Rückschlüsse auf das Absorptionsmaximum zu. Im UV-Bereich absorbierende Moleküle sind für den Betrachter dagegen transparent. Das typische Absorptionsmaximum von Proteinen liegt im UV-Bereich bei etwa 280 nm und wird durch das π -System der aromatischen Aminosäuren Tyrosin ($\epsilon_{280} = 1490 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Tryptophan ($\epsilon_{280} = 5500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) sowie zu einem kleinen Anteil durch Disulfidbindungen ($\epsilon_{280} = 125 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) hervorgerufen, während DNA-Moleküle durch die aromatischen Ringsysteme der Nukleinbasen bei etwa 260 nm absorbieren (Schmid, 2001).

2.5.2.1 Messprozedur

Zur Aufnahme von UV-VIS-Spektren wurde ein Zweistrahlphotometer (**Shimadzu UV-2401 PC**) mit einem Photomultiplier-Detektor sowie einer Wolframiodidlampe zur Generierung des Lichts im sichtbaren Bereich, die beim Wellenlängenscan ausgehend von hohen Wellenlängen bei 360 nm auf eine Deuteriumlampe für das ultraviolette Licht umgeschaltet wird (Shimadzu Scientific Instruments, 1995). Es wurden die nur wenig Probenvolumen von etwa 250 μl benötigenden 1 mm-Quarzglasküvetten (**QS**) mit einer vom Hersteller (**Hellma Analytics**) garantierten Transmission im Bereich zwischen 200 und 2500 nm von mehr als 80 % eingesetzt (Hellma Analytics, 2018).

Nach dem etwa 15-minütigen Aufwärmen des Spektrometers und dem Betätigen der AutoZero-Funktion, um das Spektrometer auf eine Absorbanz von Null zu setzen, wurde zunächst eine Basislinie aufgenommen. Dieses erfolgte entweder mit leeren Proben- und Referenzstrahlengängen oder mit wassergefüllten Küvetten in beiden Küvettenhaltevorrichtungen. Anschließend wurde eine die wässrige Probe beinhaltende Küvette in den Probenhalter platziert und gegen eine Wasser bzw. das entsprechende Lösungsmittel enthaltende Referenzküvette im voreingestellten Wellenlängenbereich (s. **Tabelle 2.7**) untersucht. Angesteuert wurde das Spektrometer über das Programm UVPC.

Tabelle 2.7: Messeinstellungen des UV-VIS-Spektrometers.

Modus:	Absorption
Wellenlängenbereich:	variabel (möglich: 190 nm – 900 nm)
Spaltbreite:	0.5 nm
Datenaufnahme ($\Delta\lambda$):	0.5 nm
Scangeschwindigkeit:	langsam

2.6. Gelelektrophorese

Die Elektrophorese beschreibt eine Methode zur Trennung von (biologischen) Makromolekülen im elektrischen Feld und beruht auf der unterschiedlichen Driftgeschwindigkeit der Moleküle aufgrund ihrer Ladung, Größe und dreidimensionalen Struktur (Atkins and Paula, 2006). Ein lineares Polymerelement zeigt andere Wanderungseigenschaften als ein knäuelartiges Molekül, so wie ein kleines und stärker geladenes Molekül schneller im elektrischen Feld vorangetrieben wird.

Eine gängige und sehr wichtige Methode ist die **Gelelektrophorese**, bei der die Moleküle durch ein angelegtes elektrisches Feld die Poren eines Polymernetzwerks aus Agarose oder einem quervernetzten **Polyacrylamid (PA)** in wässriger Umgebung durchwandern. Die Porengröße der PA-Gele lässt sich über den Anteil des Acrylamids einstellen, sodass eine größere Bandbreite an Molekülgrößen bzw. Molmassen untersucht werden kann. Eine geringere Acrylamidkonzentration bedeutet ein weitmaschigeres Netzwerk und findet bei der Gelpräparation zur Auftrennung größerer Moleküle Anwendung. Im Umkehrschluss entsteht bei höherer Acrylamidkonzentration ein engmaschiges Polymernetzwerk für die Untersuchung kleinerer Moleküle. Beispielsweise eignet sich ein 15 %-Gel, bezogen auf den Massenanteil an Acrylamid, zur vollständigen Auftrennung von Proteinen im Massenbereich zwischen 10 und 60 kDa, für größere Proteine bis 120 kDa muss ein 10%-Gel angesetzt werden (Rehm and Letzel, 2016). Referenzsubstanzen definierter Molmasse ermöglichen eine grobe Molekulargewichtseinteilung der zu analysierenden Makromoleküle. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Gelelektrophoresemethoden genutzt. Die standardisierte **SDS-PAGE (Kapitel 2.6.1)** dient der Auftrennung von Proteinen, während **FACE (Kapitel 2.6.2)** eine weniger genutzte Methode zur Analyse von Polysacchariden darstellt.

Die Präparationen der Gele und die Auftrennung wurden von L. Wiehemeier und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe PC III/BioPC unter Anweisung von U. Güth und T. Kottke (FACE) angefertigt. Die Detektion der mittels FACE aufgetrennten Polysaccharide an einem Fluoreszenzdetektionsmessgerät erfolgte in der Arbeitsgruppe BC I mit der Unterstützung von T. Beuel.

2.6.1. SDS-PAGE

Der Begriff **SDS-PAGE** ist ein Akronym für **SodiumDodecylSulfate-PolyAcrylamidGelElectrophoresis** (engl. für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und beschreibt eine der gängigsten Labormethoden in der Biochemie und Biologie zur Analyse von Proteinen bezüglich der Molmasse. Diese Elektrophoresemethode hat sich seit Jahrzehnten in den Laboren etabliert und wird dort standardmäßig durchgeführt (Rehm and Letzel, 2016). Sie ermöglicht die Untersuchung von Proben auf die vorhandenen Proteine verschiedener Molmassen

durch Vergleich mit einem Referenzstandard, der kleine Molmassen im Bereich von 1.4 bis 26.6 kDa und auch größere Molmassen bis 250 kDa abdecken kann (Bio-Rad, 2018).

Bei der SDS-PAGE wird die Wanderungsgeschwindigkeit hauptsächlich von der Molekularmasse bestimmt und hängt nicht mehr von der Ladung des Makromoleküls oder dessen dreidimensionaler Gestalt ab (Atkins and Paula, 2006). Die Zugabe des anionischen Tensids Natriumdodecylsulfat führt zur Denaturierung der Proteine durch die Bildung eines negativ geladenen, stäbchenförmigen Protein-SDS-Komplexes. Jeder Proteinkomplex hat dadurch näherungsweise das gleiche Ladung-zu-Masse-Verhältnis, wodurch der Einfluss der eigentlichen Ladung des Proteins auf die Wanderungsgeschwindigkeit eliminiert wird, und liegt in einer linearen Form vor, sodass auch die ursprüngliche Proteinstruktur irrelevant wird. Die Proteine besitzen demnach vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften und die Auftrennung erfolgt nur noch nach dem Stokes-Einstein-Radius r_h und damit nach dem Molekulargewicht. Da die native, dreidimensionale Struktur des Proteins durch die Denaturierung aufgelöst ist, hat eine größere Molare Masse immer einen größeren hydrodynamischen Radius zur Folge.

2.6.1.1 Gelpräparation

In diesem Kapitel wird die Präparation einer SDS-PAGE nach der Anleitung von Güth (2003) zusammengefasst.

Das Gel setzt sich zusammen aus einem Sammelgel mit den Maßen von etwa 10x1 cm, in dem die Proben in Taschen (z. B. 8x12 mm) aufgetragen werden, und dem angrenzenden Trenngel (< 10x10 cm), in das die aufgetragenen Moleküle bei Anlegung einer Spannung hineinwandern. Zur Präparation des Trenngels mit beispielhaft 10 % Acrylamid werden 2475 μ l Wasser mit 1500 μ l 1.5 M 2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol-Puffer (Tris) mit einem pH-Wert von 8.8, 2025 μ l der kommerziell erhältlichen Acrylamid-Bisacrylamid-Mischung (30 Gew%/ 0.8 Gew%), 60 μ l 10 Gew% SDS-Lösung, 5 μ l N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) als Katalysator, 20 μ l 10 Gew% Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) vermischt und in die 10x10 cm-Gelkammer (VWR Midi PAGE System) von 1 mm Dicke gegossen. Nach 1 h wird die Lösung für das Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Diese Lösung besteht aus 2550 μ l Wasser, 1000 μ l 0.5 M Tris-Puffer (pH 6.8), 500 μ l Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung, 40 μ l der SDS-Lösung, 8 μ l TEMED und 120 μ l AMPS.

Die Proben wurden zunächst im Volumenverhältnis von 1:1 mit einem Probenpuffer vermischt und anschließend 45 min bei +37 °C inkubiert. 1 ml des Probenpuffers bestand dabei aus 100 μ l Dithioerythrit (DTE) zur Spaltung von Disulfidbrücken im Protein, 100 μ l 0.5 M Tris-Puffer, dessen pH-Wert mit HCl auf 6.8 eingestellt war, 200 μ l Glycerin, 250 μ l 10 Gew% SDS-Lösung, 200 μ l 0.1 Gew% Bromphenolblau (BPB) zur Visualisierung der laufenden Probenfront und 150 μ l Wasser. Von der Probe-Puffer-Mischung und dem Referenzmarker (s. [Abbildung 2.38](#)) wurden

mindestens 10 μl bis maximal 25 μl auf das Sammelgel aufgetragen. Nach Anlegen einer Startstromstärke von 35 mA wurden die Proben für etwa 30 min laufen gelassen, bis die Laufmittelfront am unteren Ende des Gels angekommen war. Die anschließende Fixierung und Färbung der Proteine erfolgte mit **Coomassie Brilliant Blau G-250** (Struktur s. **Abbildung 2.38**) durch Behandlung des Gels mit einer wässrigen Lösung von 0.05 Gew% des Farbstoffs in einem Gemisch aus 10 Vol% Essigsäure und 30 Vol% Methanol.

2.6.1.2 Coomassie Brilliant Blau

Die Färbung der aufgetrennten Proteine über den Farbstoff **Coomassie Brilliant Blau** ermöglicht eine Detektion mit dem bloßen Auge. Die Nachweisgrenze liegt bei 200-400 ng pro 0.5 cm Bande (Rehm and Letzel, 2016). Der Triphenylmethanfarbstoff (s. **Abbildung 2.38**) lagert sich an die basischen Aminosäuren der Proteine und führt daher zu einer Färbung der mit Proteinen belegten Positionen des Gels. Dabei verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm. Der Farbstoff selbst hat eine Molare Masse von 854.02 Da.

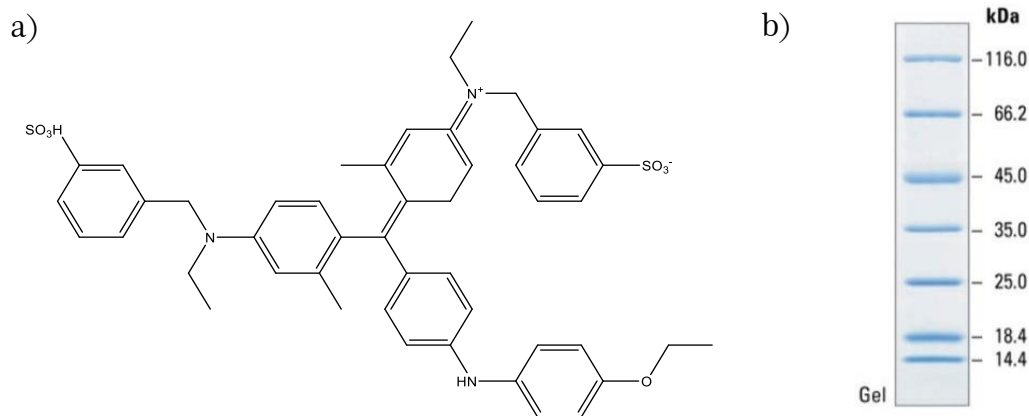


Abbildung 2.38: a) Strukturformel des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie Brilliant Blau G-250. b) Verwendeter Referenzmarker mit sieben Proteinen der Molmassen 14.4 bis 116 kDa nach Auftrennung in der SDS-PAGE und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt (rechts). Abbildung entnommen aus (ThermoFisher Scientific, 2018).

2.6.1.3 Silberfärbung nach Coomassie Blau

Eine weitaus sensitivere Färbemethode ist die sogenannte **Silberfärbung**, bei der die Nachweisgrenze bis in den Nanogramm-Bereich reicht. Tritt der Fall auf, dass die Proteinbanden in dem Gel nach Coomassie Blau-Färbung zu schwach oder gar keine Banden zu sehen sind, kann eine anschließende Silberfärbung Abhilfe bringen. Mit dieser Methode lassen sich 5-30 g Protein pro 0.5 cm Bande detektieren (Rehm and Letzel, 2016). In der folgenden **Tabelle 2.8** ist der Ablauf der Silberfärbung aus einem Präparationsblatt der BC I niedergeschrieben (Neuhaus, 2015). Diese Färbemethode beruht auf der Anlagerung von Silberionen aus dem zugegebenen Silbernitrat an die negativ geladenen Proteinseitenketten (Glutamin- und Asparaginsäure) sowie an Cystein und der sich ergebenden Schwarzfärbung des Gels an diesen Stellen aufgrund

der Reduktion der Ionen zu elementarem Silber durch Formaldehyd. Allerdings ist diese Färbemethode nicht proteinspezifisch, da auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide angefärbt werden.

Tabelle 2.8: Vorschrift für die Durchführung einer Silberfärbung nach erfolgter Färbung mit Coomassie Blau nach Neuhaus (2015).

Schritt	Ausführung	benötigte Lösung(en)
1. Waschen	Coomassie Blau gefärbte Gele für 20 min in VE-Wasser waschen	
2. Sensitivieren	Mit 0.02 Gew% Natriumthiosulfatlösung 1 min sensitivieren	0.04 g Na ₂ S ₂ O ₇ (wasserfrei) in 200 ml VE-Wasser
3. Waschen	3 x 20 s mit VE-Wasser waschen	
4. Färbung	Zugabe von kalter (auf Eis gekühlter) 0.2 Gew%-iger Silbernitratlösung; Schütteln bei +4 °C für 20 min	0.4 g AgNO ₃ in 200 ml VE-Wasser + 108 µl 37 Vol%-iges Formaldehyd (0.05 Vol% gesamt)
5. Waschen	3 x 20 s mit VE-Wasser waschen	
6. Wechsel	Schale wechseln	
7. Waschen	1 min mit VE-Wasser waschen	
8. Entwickeln	Zugabe von 3 Gew% Natriumcarbonat/ 0.05 Vol% Formaldehyd	6 g Na ₂ CO ₃ (wasserfrei; 99.5 %) in 200 ml VE-Wasser + 108 µl 37 Vol%-iges Formaldehyd (ges. 0.05 Vol%)
9. Waschen	1 x 20 s mit VE-Wasser waschen	
10. Färbestopp	Zugabe von 5 % Essigsäure	1 M Essigsäure (6 Gew% bzw. 5.7 Vol%)
11. Waschen	3 x 10 min mit VE-Wasser waschen	

Die Schritte 8 bis 10 sind zeitkritische Schritte. Die Färbung des Gels erfolgt zeitlich nichtlinear und wird erst durch Zugabe der Essigsäure unterbunden. Eine zu lange Entwicklung kann zu einer Überfärbung der Banden und des gesamten Gels führen.

2.6.2. Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis

Eine Modifikation der Gelelektrophorese zur Auftrennung von Polysacchariden ist die **Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis** (Apronym: FACE), die in (Goubet et al., 2011) als Standard-Prozedur beschrieben ist. Hierbei wird der für die Detektion der zu untersuchenden Moleküle benötigte Farbstoff vor der elektrophoretischen Auftrennung kovalent mit dem Molekül verknüpft. In der Arbeit von (Wiehemeier, 2015) wurde die Prozedur von (Goubet et al., 2011) mit individuellen Änderungen

angewandt, die im Folgenden als Zusammenfassung aus Dreischmeier et al. (2017) dargelegt ist.

20 μL einer 0.1 M Lösung des dreifach negativ geladenen Farbstoffs 8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonat (ANTS; **Abbildung 2.39**) in einem Essigsäure-Wasser-Gemisch mit einem Volumenverhältnis von 3:17 und 20 μL einer 0.5 M Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3)-Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden zu 1-2 mg der gefriergetrockneten Polysaccharidprobe gegeben. Die homogen vermischte Probe wurde zentrifugiert und der Überstand für 18 h bei $+37\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach der anschließenden Gefrierdrying wurden 100 μL einer 6 M wässrigen Harnstofflösung zu der derivatisierten Polysaccharidprobe gegeben.

Für die Gelelektrophorese wurde ein VWR Midi PAGE System mit einer Größe von 10x10 cm von 1 mm Dicke verwendet. Zur Herstellung des Polyacrylamidgels (20 % w:v) wurden 4 mL einer kommerziell erhältlichen Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Mischung in Wasser (30 Gew%/ 0.8 Gew%) mit 1975 μL 0.1 M Tris-Borat-Puffer mit einem pH-Wert von 8.2, 5 μL Tetramethylethylen-diamin (TEMED) und 20 μL einer wässrigen Ammoniumperoxodisulfatlösung (AMPS, 10 Gew%) vermischt. Nach der innerhalb von 1 h erfolgten Polymerisation dieses Laufgels wurde ein 1 cm hohes Sammelgel präpariert, indem 1066 μL der Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung, 2900 μL des Puffers, 6 μL TEMED und 30 μL der AMPS-Lösung auf das Laufgel gegossen und ebenfalls für eine Stunde polymerisieren gelassen wurden. Anschließend wurden 20 μL der mit dem Fluoreszenzfarbstoff derivatisierten Polysaccharidlösung in eine Tasche des Sammelgels pipettiert und gegen eine 0.5 μM Lösung einer mit dem Farbstoff 9-Aminopyren-1,3,6-Trisulfonsäure (**Abbildung 2.39**) markierten Maltodextrin-Leiter als Referenz 20 min bei 200 V und für weitere 25 min bei 500 V elektro-phoresiert.

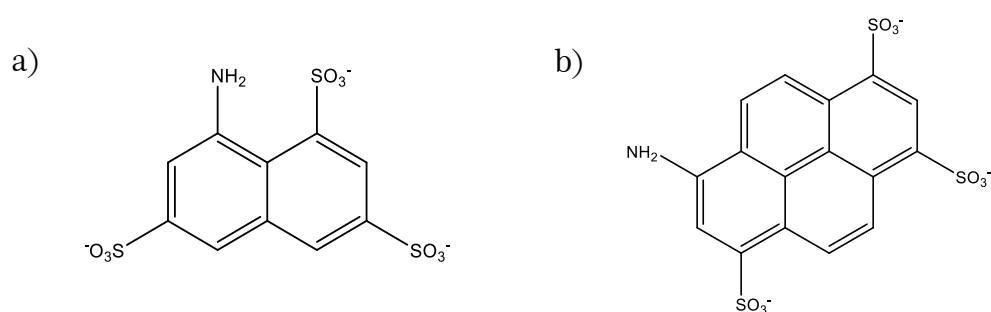


Abbildung 2.39: Molekülstruktur der Farbstoffe a) ANTS und b) APTS.

Nach der Auftrennung erfolgte die Detektion der Zuckermoleküle über ein Fluoreszenz-Bildanalysesystem (FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-3000) mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm. Die Banden des Referenzmarkers APTS ($M = 523\text{ Da}$) erscheinen in Abständen der Monomereinheit Glucose mit 180 Da im Molmassenbereich von etwa 900 Da (APTS + zwei Einheiten Glucose) bis maximal 3.4 kDa (APTS + 16 Einheiten Glucose) mit einem Intensitätsmaximum zwischen 1.4 und 2.1 kDa (PROzyme, 2015). Die Voraussetzung einer möglichst genauen

Molmasseneinteilung der Moleküle der Probe ist eine ungeladene Polysaccharidkette wie bei der Markersubstanz, sodass die Wanderungsgeschwindigkeit lediglich durch den dreifach negativ geladenen Farbstoff am reduzierenden Ende des Polysaccharids bestimmt wird (**Abbildung 2.40**).

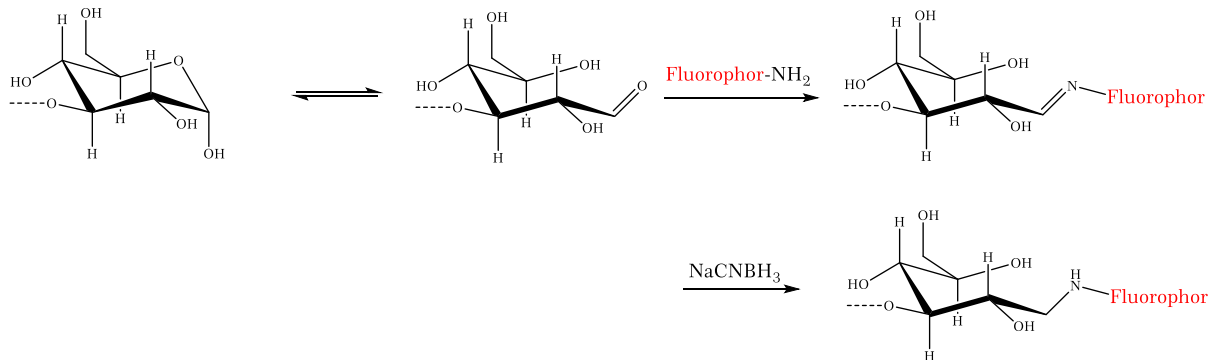


Abbildung 2.40: Verknüpfung des reduzierenden Endes von D-Glucose mit der primären Aminogruppe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Cyanoborhydrid fungiert als Reduktionsmittel des sich bildenden Imins. Schema angelehnt an Abbildung 2 in (Meunier, F. and Wilkinson, K. J., 2002).

2.7. Duale Funktion molekularer Eisnukleatoren und -inhibitoren

In den Kapiteln 2.1 und 2.3 wurden die Grundlagen der Eisnukleation und der Antigeftrieraktivität von Molekülen dargelegt, indem die Funktionsweise und molekularen Voraussetzungen der aktiven Moleküle als heterogene Eisnukleatoren und vor allem für die Antigeftriereigenschaften detailliert erörtert wurden. Da für eisnukleierende Proteine im Gegensatz zu den AF(G)Ps aufgrund der Größe (> 120 kDa), der Tendenz zur Clusterbildung und der häufigen Funktion als Membranprotein keine Kristallstrukturen verfügbar sind, ist eine genaue Erfassung des molekularen Mechanismus der Eisnukleation erschwert (Garnham et al., 2011b). Die Aktivität als Antigeftrieremolekül beruht auf einer spezifischen Erkennung des Eiskristalls über die eisähnlich angeordneten Wassermoleküle in der Hydrathülle des Proteins an der eisbindenden Stelle. Daher stellt sich die schon seit längerem diskutierte Frage, ob die Fähigkeit molekularer Eisnukleatoren, an ihrer aktiven Stelle einen eisähnlichen Cluster kritischer Größe aus Wassermolekülen zu bilden, ebenfalls auf einer Wechselwirkung der eisähnlich strukturierten Hydrathülle mit Eis basiert (Davies, 2014). Demnach sollte jeder molekulare Eisnukleator ebenfalls eisbindenden Charakter besitzen und im Umkehrschluss jedes Antigeftrieremolekül eine der Größe der eisbindenden Stelle entsprechende Eisnukleationstemperatur aufweisen.

Die Eigenschaft einiger Antigeftriersubstanzen als Anti-Eisnukleatoren, die die Eisnukleationsaktivität von heterogenen Eiskeimen herabzusetzen vermögen, weist auf eine Interaktion der eigentlich gegensätzlich fungierenden Eiskeime und Antigeftrieremoleküle hin (Holt, 2003; Dreischmeier, 2009; Inada et al., 2012; Yamashita et al., 2014; Bredow et al., 2018; Inada et al., 2017).

Eine etwas ältere Studie von Xu et al. (1998) konnte zeigen, dass ein AFGP des Rhizobakteriums *Pseudomonas putida* mit einer TH von 0.1 °C tatsächlich selbst eine Eisnukleationsaktivität bei -12 °C aufweist. Diese wird durch Entfernung der 92 kDa großen Kohlenhydrateinheit des Proteins eliminiert, während die Antigeftrieraktivität beibehalten bleibt. Es ist hierbei das unüblich große Molekulargewicht des Antigeftrierglykoproteins von 164 kDa zu erwähnen, was im Zusammenhang mit der Aktivität als Eisnukleator zu stehen scheint. Da der sehr aktive heterogene Eiskeim aus *P. syringae* in mikrometergroßen Membranbruchstücken verankert ist, ist eine Untersuchung auf Antigeftrieraktivität erschwert. Daher wurde in der Arbeit von Kobashigawa et al. (2005) eine Untersuchung eines 96 Aminosäuren umfassenden Ausschnitts des eisnukleierenden Proteins bezüglich der Eisstrukturierung und der Thermischen Hysterese durchgeführt. Das positive Ergebnis bei hohen Konzentrationen von ~400 µM bzw. 1.5 mM ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, da es sich nicht um das vollständige Protein in seiner nativen Faltung handelt. Es zeigt aber die Anwesenheit von eisbindenden Stellen in dem Peptid auf. Auch für Graphenoxid (GO) konnte neben der Funktion als Eisnukleator (Whale et al., 2015) die gegenseitige Funktion als Eisrekristallisationsinhibitor (Geng et al., 2017)

beobachtet werden. In dieser Arbeit betreute Forschungen konnten eine heterogene Eisnukleationsaktivität von den komplexbildenden Verbindungen Safranin T (Sabadasch, 2017) und Zirkoniumacetat (Eickhoff, 2017), deren Antigeefrieraktivität zuvor gezeigt worden war (Drori et al., 2016; Deville et al., 2011), in BINARY-Experimenten präsentieren. Bei der Vermessung von PVA enthaltenen wässrigen Emulsionen (Dreischmeier, 2009; Wolf, 2018) ist eine Verschiebung des Gefriersignals zu höheren Temperaturen im DSC-Thermogramm zu beobachten. Zugrunde liegen kann dieser erhöhten Nukleationsaktivität ein heterogener Eisnukleationsmechanismus, der möglicherweise durch 10 nm große Mikrogele von PVA ausgelöst wird (Ogawa et al., 2009). Andererseits wurde in einer Modellierungsstudie ein homogener Nukleationsprozess bei einer Wasseraktivität $a_w > 1$ aufgezeigt (Mochizuki et al., 2017). Studien von (Charpentier et al., 2013) und (Liu et al., 2016) deuteten am Beispiel von AFPs einen Dualismus an, da eine Erhöhung der Eisnukleationstemperaturen durch auf einer Oberfläche immobilisierte Proteine gezeigt wurde.

Besonders in den letzten Jahren bekam die Fragestellung der dualen Funktion durch Modellierungen der molekularen Struktur an der mit Eis wechselwirkenden Stelle der Proteine Auftrieb. Am Beispiel von TmAFP (Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S., 2017; Hudait et al., 2018b), MpAFP (Garnham et al., 2011a), sbwAFP (Kuiper et al. (2015); sbw: spruce budworm; Schmetterlingsart), und einem AFP III über spektroskopische Messungen (Meister et al., 2014), konnte für Antigeefrierproteine eine Beteiligung einer eisähnlichen, vororganisierten Hydrathülle um die eisadsorbierende Stelle an der Antigeefrieraktivität bestätigt werden. Gleiche Ergebnisse bezüglich der eisnukleationsaktiven Stelle ergaben Modellierungsstudien an eisnukleierenden Proteinen bzw. deren Modellpeptid-Abschnitten von *P. borealis* (PbINP) (Garnham et al., 2011b), *P. syringae* (PsINP) (Pandey et al., 2016) sowie einem Lipoprotein (LpINP) (Bäumer et al., 2016).

An dieser Überlegung eines sogenannten **Janus-Effekts** sämtlicher Eisnukleatoren und auch sämtlicher Antigeefriermoleküle baut sich diese Arbeit auf, um die Hypothese am Beispiel der Eisnukleatoren aus Birkenpollen und *M. alpina* sowie dem Antigeefrierprotein des *T. molitor* zu überprüfen. Die bisher noch nicht veröffentlichte, in Vorbereitung stehende Untersuchung von Eickhoff et al. (2018) auf eine duale Funktion zeigt in der Tat eine schwache Eisnukleationsaktivität sowohl von TmAFP ($T_{50} \sim -31$ °C), dessen Analyse zum Teil Gegenstand dieser Arbeit ist, als auch von AFP III ($T_{50} \sim -33$ °C), das in einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Y. Rudich, Weizmann Institut, Rechovot, Israel) vermessen wurde. Damit wird die Größe des Moleküls als entscheidender Faktor für die dominierende Aktivität deutlich, wie auch in **Abbildung 2.41** veranschaulicht ist: Antigeefriermoleküle sind in der Regel kleine Moleküle ($< \sim 30$ kDa) und generieren demnach gemäß der klassischen Nukleationstheorie Eiscluster mit einem kleinen kritischen Radius, der einer niedrigen Nukleationstemperatur < -30 °C entspricht. Diese niedrigen

Nukleationsaktivitäten sind nur mit sehr sensitiven Messinstrumenten mit geringer Hintergrundnukleation wie in der Mikrofluidik (Eickhoff, 2017; Reicher et al., 2017; Eickhoff et al., 2018) erfassbar.

Dagegen sind (biologische) eisnukleierende Moleküle typischerweise größer als 100 kDa, sodass sie höhere Nukleationstemperaturen oberhalb von -25 °C aufweisen. Eine Detektion der Antifrieraktivität dieser Eisnukleatoren kann etwa durch die Konzentration limitiert sein, weil im Gegensatz zur Eisnukleation, die durch ein einziges Molekül ausgelöst werden kann, mehrere Moleküle benötigt werden, um das Kristallwachstum zu stoppen. Bei sehr großen Molekülen kann zudem aufgrund ihrer geringen Diffusionsgeschwindigkeit ein Andocken an einen entfernten Eiskristall verhindert sein, was eine geringe Antifrieraktivität zur Folge hat.

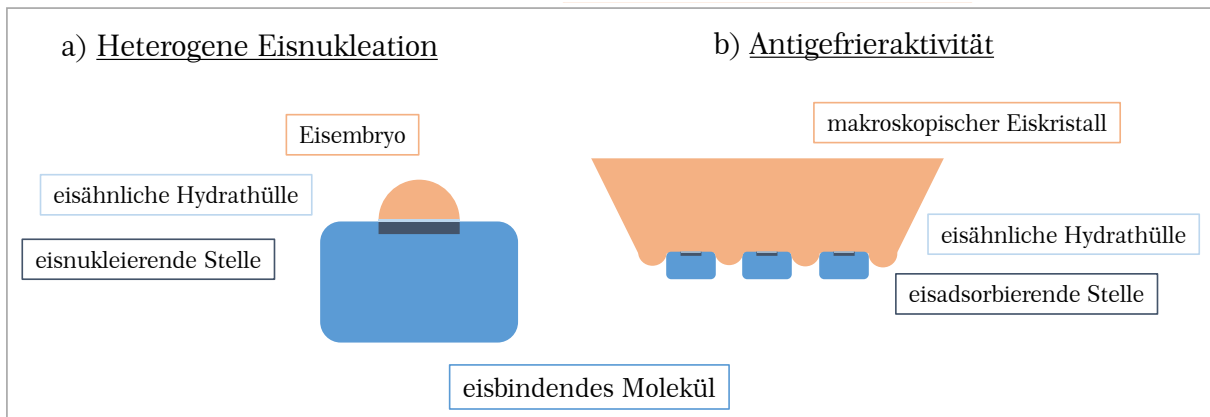


Abbildung 2.41: Verallgemeinertes Bild der Wechselwirkung zwischen Eis und einem Molekül mit eisbindenden Eigenschaften zum Verständnis der heterogenen Eisnukleationsaktivität und der Antifrieraktivität, unter der Annahme des gleichen molekularen Mechanismus der Erkennung von Eis. a) An der eisnukleierenden Stelle (dunkelblau) des großen, eisnukleierenden Moleküls (blau) bildet sich eine Hydrathülle eisähnlicher Struktur aus (hellblau), an der sich ein kritischer Eisembryo (orange) bilden kann. b) Mehrere Moleküle geringer Größe (blau) und kleinerer aktiver Stelle (dunkelblau) adsorbieren über eine eisähnliche Hydrathülle (hellblau) an den Eiskristall (orange), dessen Wachstum durch die Ausbildung konvexer Formen zwischen den adsorbierten Molekülen gehemmt ist.

3. Ergebnisse und Interpretation

Mittels der in den [Kapiteln 2.2](#) und [2.4](#) beschriebenen Messmethoden werden in dieser Arbeit verschiedene biologische Proben auf ihre Eisnukleationsaktivität (BINARY und DSC; Mikrofluidik) und der Antigefriereigenschaften (Eisstrukturierung, Eisrekristallisationsinhibierung; Thermische Hysterese) untersucht. Während die Nukleationseigenschaften von Makromolekülen aus Birkenpollen (Pummer et al., 2012; Augustin et al., 2013; O'Sullivan et al., 2015) und dem Pilz *Mortierella alpina* (Pummer et al., 2015; Fröhlich-Nowoisky et al., 2015) aus bisherigen Publikationen bekannt sind, wird in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob diese Eisnukleatoren ebenso Antigefrieraktivität besitzen. Das Antigefrierproteins aus *Tenebrio molitor* (TmAFP) wird bezüglich einer dualen Funktion von der entgegengesetzten Seite aus untersucht. Dazu soll eine mögliche Eisnukleationsaktivität des Proteins, für das Thermische Hystereseexperimente (Marshall et al., 2002; Scotter et al., 2006; Bar et al., 2008; Drori et al., 2014) auf eine Hyperaktivität hinweisen, mithilfe der Mikrofluidik nachgewiesen werden. Die Infrarotspektroskopie soll Aufschluss geben über die Funktionalitäten der aktiven Moleküle, nachdem die eisbindenden Moleküle aus den Proben über die Eisaffinitätsaufreinigung extrahiert wurden. Weitere Experimente wurden zur Aufklärung der an der Nukleations- oder Antigefrieraktivität beteiligten funktionellen Gruppen durchgeführt, indem ein möglicher Einfluss verschiedener Substanzen auf die jeweilige Aktivität untersucht wurde.

Mithilfe des aus Publikationen erlangten und in den Theorieabschnitten [2.1](#) und [2.3](#) zusammengefassten Wissens werden die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen in den folgenden drei Kapiteln, die sich auf die Birkenpollen ([Kapitel 3.1](#)), *M. alpina* ([Kapitel 3.2](#)) und TmAFP ([Kapitel 3.3](#)) aufteilen, dargelegt und interpretiert.

3.1. Birkenpollen

Den Untersuchungen zu den Eisnukleations- ([Kapitel 3.1.1](#)) und Antigefrieraktivitäten ([3.1.2](#)) sowie der strukturellen Analytik ([3.1.3](#)) der Birkenpollen wurde während dieser Arbeit die meiste Zeit gewidmet. Aus diesem Abschnitt der Arbeit ist dementsprechend auch eine umfangreiche Publikation mit zahlreichen Experimenten und Ergebnissen entstanden (Dreischmeier et al., 2017). Die folgenden Unterkapitel sind daher eng an der Publikation orientiert, in denen zusätzlich einige weitere Informationen und Ergebnisse dargelegt werden, die die Publikation inhaltlich gesprengt hätten.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Birkenpollenlieferungen (europäische Weißbirke; *Betula pendula*) für die Untersuchungen eingesetzt. Alle drei Lieferungen stammten von der US-amerikanischen Firma **GREER**, die die in Frankreich gesammelten Pollen für die allergische Immuntherapie vertreiben. In [Tabelle 3.1](#) sind genauere Angaben der Firma bezüglich der Sammlungsdaten und Verunreinigungen

zur Übersicht aufgelistet (GREER, 2013-2015). Dabei wird deutlich, dass die Proben #A und #C zu etwa der gleichen Zeit gesammelt wurden und dementsprechend sehr ähnliche LOT-Nummern haben, während die zweite Probe #B sich von den anderen beiden bezüglich des Sammlungsdatums unterscheidet. Dieser Umstand kann die beobachteten Eisnukleationsaktivitäten und IR-Bandenmuster erklären, worauf in den **Kapiteln 3.1.1** bzw. **3.1.3** eingegangen wird.

Tabelle 3.1: Informationen zu den drei Birkenpollen-Lieferungen bezüglich der Sammlungsdaten und der Verunreinigungen (GREER, 2013-2015).

Name	LOT#	Sammlungsdatum/-ort	Kontamination
#A	P1329870-1/-2	30.03.2011, Frankreich	2.16 % Pflanzenteile; 0.39 % Sporen oder andere Pollen
#B	P3317516-1	18.04.2013, Frankreich	3.04 % Pflanzenteile
#C	P1329872-1	März 2011, Frankreich	0.98% Pflanzenteile; 0.29 % Sporen oder andere Pollen

Zur Präparation der Pollensuspensionen wurde eine abgewogene Menge Birkenpollen mit einer ebenfalls abgemessenen Menge von frisch bidestilliertem VE-Wasser aufgenommen und das Gefäß mehrmals geschwenkt, bis das gesamte Pollenmaterial suspendiert war. Um das **Birkenpollenwaschwasser** (abgekürzt **BPWW**) zu erhalten, wurde die Suspension durch einen 0.2 μm -PES-Spritzenvorsatzfilter filtriert. Bei einer größeren Menge an Pollen, wie sie für die Eisaufreinigung (IAP) benötigt wurde, wurde die Suspension nach mehrminütigem Rühren durch einen 5 μm CN-Filter filtriert und der Filterüberstand mehrmals mit Wasser gewaschen. Dieses Waschwasser wurde für die Aufreinigung eingesetzt und erst während des anschließenden Aufkonzentrierens am Rotationsverdampfer (im Wasserbad bei Temperaturen zwischen +20 bis +30 °C bei reduziertem Druck von ~20 mbar) durch den 0.2 μm -Spritzenvorsatzfilter filtriert. Generell wurden die Proben am Tag des Experimentes angesetzt und anschließend verworfen. Wurde die Probe über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen oder Wochen für Messungen benötigt, wurde sie in der Zwischenzeit im Gefrierschrank bei -18 °C aufbewahrt, um Alterungsprozesse zu verhindern.

3.1.1. Heterogener Eisnukleator aus Birkenpollen

Aus zahlreichen früheren Studien ist die Nukleationsaktivität der Birkenpollen bei Temperaturen oberhalb von -20 °C bekannt (Diehl et al., 2002; von Blohn et al., 2005; Pummer et al., 2012; Augustin et al., 2013; Pummer et al., 2015; O'Sullivan et al., 2015). Nachdem zunächst von Diehl et al. (2002) und von von Blohn et al. (2005) die poröse Pollenoberfläche als die aktive Stelle vermutet worden waren, konnten Pummer et al. (2012) als erste zeigen, dass wasserlösliche organische Verbindungen aus den Pollen für die Eisnukleationsaktivität verantwortlich sind, da das

abdekantierte Waschwasser der Pollensuspension die gleiche Nukleationstemperatur aufwies. Weitere Experimente in dieser und in einer folgenden Studie (Pummer et al., 2015) ließen auf ein Polysaccharid mit einer Größe zwischen 100 und 300 kDa schließen, da der molekulare Eisnukleator durch die mit Hydroxylgruppen Komplexe bildende Borsäure inaktiviert wird und sowohl hitzeresistent (bis +142 °C) als auch unempfindlich gegenüber Proteine spaltende Proteasen ist. Der geringe Einfluss des Chaotrops Guanidiniumchlorid auf die Nukleationstemperatur schien den nicht-proteinösen Charakter zu bestätigen. Zur Überprüfung oder Ergänzung dieser aufgestellten Vermutungen wurden in dieser Arbeit sowohl Nukleationsmessungen an Birkenpollensuspensionen und deren Waschwasser durchgeführt (folgender Absatz) als auch der Einfluss einiger Substanzen auf die Nukleationsaktivität untersucht, was in **Abschnitt 3.1.1.1** dargelegt wird.

In der dieser Arbeit vorhergehenden Masterarbeit (Dreischmeier, 2013) konnte über die Vermessung einer Verdünnungsreihe einer Suspension der Birkenpollen #A (BPS) am BINARY aus dem maximalen Wert des nach **Gleichung (2.22)** berechneten kumulativen Keimpektrums die Gesamtzahl von $\sim 10^4$ eisnukleierenden Molekülen pro eingesetztem Pollenkorn (s. **Tabelle 3.2**) bei einer Temperatur von -23 °C erhalten werden (**Abbildung 3.1**: offene grüne Kreise, BPS #A). Bei zunehmender Verdünnung (in **Abbildung 3.1** dargestellt am Beispiel von BPWW #B anhand verschieden farbiger Datenpunkte), die gleichbedeutend mit steigenden n_n -Werten und sinkenden Nukleationstemperaturen ist, tritt irgendwann der Fall ein, dass ein Tropfen nur noch einen Eiskeim enthält. Bei weiterer Verdünnung wird schließlich ein Plateau erreicht, das den Übergang zu dem Nukleationsbereich von Wasser darstellt. Aus der Lage des Plateaus kann daher die maximale Anzahl an aktiven Eiskeimen abgelesen werden.

Das Ergebnis deckt sich mit den Werten von $2 \cdot 10^4$ bzw. $8 \cdot 10^3$ aus den Experimenten anderer Arbeitsgruppen (Augustin et al., 2013; O'Sullivan et al., 2015). Deren Messdaten sind ebenfalls in **Abbildung 3.1** als Linie aus einer Parametrisierung (Augustin et al., 2013) bzw. als graue Symbole (O'Sullivan et al., 2015) dargestellt. Die Daten von O'Sullivan et al. (2015) wurden aus dem in deren Publikation gezeigten $n_m(T)$ -Diagramm entnommen und in $n_n(T)$ umgerechnet, indem wie für die eigenen Daten eine Pollendichte von 1 g cm^{-3} und ein Pollendurchmesser von $24 \text{ }\mu\text{m}$ (Dreischmeier, 2013) angenommen wurden. Die Tatsache, dass die Anzahl an Eiskeimen pro Pollenkorn deutlich über 1 liegt, gibt einen ersten Hinweis auf den wasserlöslichen Charakter dieser, der durch die Messungen an dem $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ -Filtrat (geschlossene grüne Kreise: BPWW #A; rot: #B) bestätigt wird.

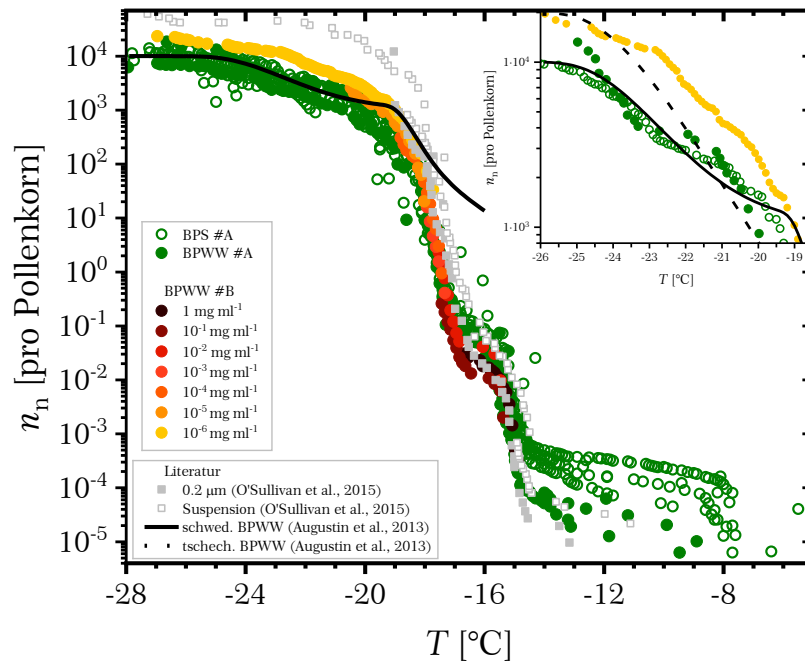


Abbildung 3.1: Kumulative Keimspektren $n_n(T)$ für Birkenpollen #A (grün) und #B (rot) im Vergleich mit Literaturdaten (schwarze, gestrichelte Linie und graue Punkte) für eine Kühlrate von -1 °C min^{-1} . Dabei stehen offene Symbole für Waschwasser ($0.2\text{ }\mu\text{m}$ Filtrat), geschlossene für Suspensionen. Die Nukleation wird von wasserlöslichen Molekülen aus den Birkenpollen ausgelöst, was zum einen an der vergleichbaren Nukleationsaktivität von Waschwasser und Suspension und zum anderen an der absoluten Anzahl von 10^4 Eiskeimen pro Pollenkorn, wenn die Kurve das letzte Plateau erreicht und in den Wasserbereich übergeht, bestätigt wird. Birkenpollen #A und #B besitzen einen bei -15 °C aktiven, wasserlöslichen Eiskeim (~ 0.1 Keim pro Pollenkorn) sowie einen weiteren, deutlich häufiger auftretenden Eiskeim ($\sim 10^4$ Keime pro Pollenkorn), der bei -18 °C nukleiert. Die Pollen #A enthalten zusätzlich, wie die schwedischen Birkenpollen (Strich-Punkt-Linie; Augustin et al. (2013)), einen dritten Eiskeim mit einer Nukleationstemperatur von $\sim -23\text{ °C}$ (s. Inset). Die Nukleationsereignisse oberhalb von -14 °C ($< 5 \cdot 10^{-4}$ Keime pro Pollenkorn) sind hauptsächlich in den Pollensuspensionen zu beobachten. Die Keimspektren entstanden in einer Verdünnungsreihe, die am Beispiel des BPWW #B (dunkelrot bis gelb) dargestellt ist.

Aus dem kumulativen Keimspektrum sind mehrere Eiskeime den Birkenpollen zuzuordnen, die sich über die verschiedenen Anstiege und Plateaus erkennen lassen. Die Nukleationsereignisse oberhalb von -14 °C sind in dem Waschwasser (Konzentrationen 2 mg ml^{-1} bis 8 mg ml^{-1} mit nicht detektierbarer Gefrierpunkterniedrigung) nur noch in geringerer Anzahl vorhanden, woraus ein Zusammenhang mit den Pollenkörnern abgeleitet werden kann. Im Waschwasser sind zwei Eisnukleatoren bei -15 °C bzw. -18 °C aktiv, was nicht nur mit der Datenkurve von O'Sullivan et al., (2015) sondern auch mit den Ergebnissen bezüglich der Median-Nukleationstemperaturen von Pummer et al. (2012) bei derselben Kühlrate ($(-18/-19 \pm 1)\text{ °C}$) und von Augustin et al. (2013; -18 °C) übereinstimmt.

Zusätzlich zu dem bei -18 °C aktiven Eiskeim kann in DSC-Experimenten (Abbildung 3.2; 4 mg ml^{-1}) ein zweiter heterogener Nukleator bei $\sim -22\text{ °C}$ in BPWW #A (grün) und #C (blau) detektiert werden, der in dem kumulativen Keimspektrum von #A (grün) in einer vergrößerten Darstellung (s. eingeklinkte Graphik) anhand des erneuten Anstiegs in $n_n(T)$ bei $\sim -23\text{ °C}$ zu erahnen ist. Der Verlauf dieser Messdaten

ist dabei gut mit der als durchgezogene Linie gezeigten Parametrisierung von Augustin et al. (2013) für die schwedischen Birkenpollen beschrieben, die ebenfalls neben dem bei -18 °C aktiven Eiskeim einen zweiten bei $\sim -23\text{ °C}$ nukleierenden enthalten. Dagegen weisen die Birkenpollen #B (rot), wie in dem DSC-Thermogramm zu sehen ist, nur den aktiveren Eiskeim auf. Auch diese Beobachtung einer zweiten Birkenpollenart, die nur einen der beiden Eiskeime produziert, wurde zuvor von Augustin et al. (2013) am Beispiel der tschechischen Birkenpollen (-18 °C) gezeigt. Die in dem Einsatz in **Abbildung 3.1** dargestellte $n_n(T)$ -Kurve von BPWW #B (gelbe Datenpunkte) kann mit der Parametrisierung der Nukleationsdaten der nur den aktiveren Keim enthaltenen tschechischen Birkenpollen (gestrichelte Linie) beschrieben werden. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass die Pollen #B auch geringe Mengen des schwächeren, bei -23 °C nukleierenden Eiskeims aufweisen. Das heterogene Signal im DSC-Thermogramm (rot) könnte ebenso eine Überlagerung der beiden Signale sein, zu dem das Signal des bei -18 °C aktiven Keims zu einem deutlich beträchtlicheren Anteil beiträgt.

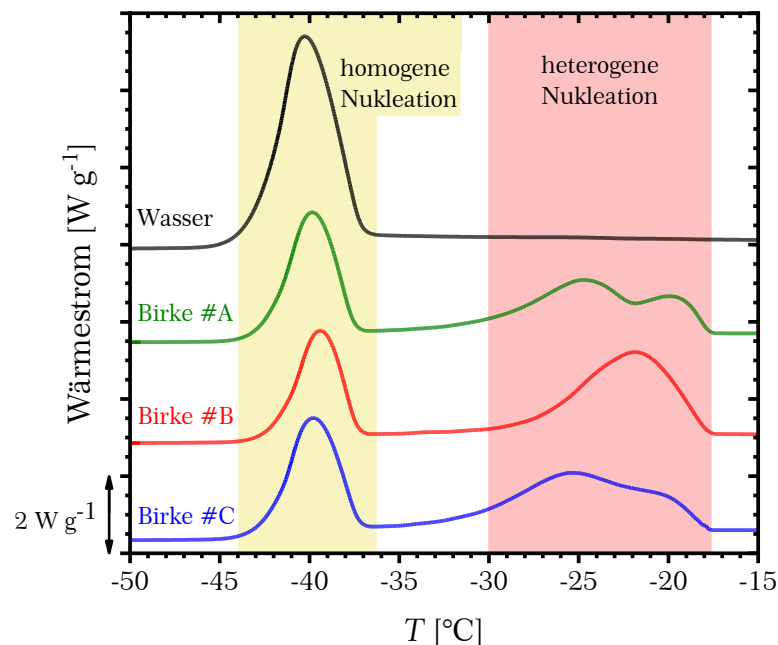


Abbildung 3.2: DSC-Thermogramme von Wasser (schwarz) und BPWW #A (grün), #B (rot) und #C (blau) für eine jeweilige Konzentration von 5 mg ml^{-1} bei einer Kühlrate von -5 °C min^{-1} . Neben der in allen Proben zu beobachtenden homogenen Nukleation (gelb markierter Bereich) mit einer Onsettemperatur von -37 °C treten in den Birkenpollen-Proben auf die heterogene Eisnukleation zurückzuführende Signale im Bereich zwischen -20 und -30 °C auf. Während BPWW #A und #C zwei Eisnukleatoren mit Onsettemperaturen von -18 °C sowie -22 °C aufweisen, ist in der Probe #B nur ein Keim, der bei -18 °C nukleiert, enthalten.

Der in den kumulativen Keimspektren beobachtete Keim mit einer Nukleationstemperatur von -15 °C kann aufgrund seiner geringen Konzentration von ~ 0.1 Keim pro Polle in DSC-Messungen nicht detektiert werden, da das entsprechende Signal unterhalb der Detektionsgrenze des Messgerätes liegt. Denn selbst die zu einem deutlich höheren Anteil vorkommenden, bei -18 °C bzw. $-22/-23\text{ °C}$ aktiven Eiskeime ($\sim 10^4$ pro Polle) sind nicht in jedem der $1-10\text{ }\mu\text{m}$ großen wässrigen Tropfen (s. **Abbildung A.12**) enthalten, worauf das Auftreten eines homogenen

Nukleationssignals bei -37 °C hindeutet. Die heterogenen Nukleationssignale resultieren von Tröpfchen mit wenigen oder nur einem einzigen Eiskeim.

Die Fläche unter den heterogenen Signalen lässt Rückschlüsse auf das Konzentrationsverhältnis der beiden Eiskeime in #A und #C zueinander zu. Demnach liegt der schwächere, bei -22 °C nukleierende Eiskeim in 1.5-facher Menge relativ zu dem aktiveren Keim vor. Aus den Plateaus im kumulativen Keimspektrum von #A ergibt sich für den bei -18 °C Nukleation auslösenden Eisnukleator eine Konzentration von $\sim(3-4)\cdot 10^3$ pro Pollenkorn und von etwa $(1-1.3)\cdot 10^4$ Molekülen für den weniger aktiven Keim. Die Gesamtanzahl an Eisnukleatoren ist mit der Konzentration der in den Birkenpollen #B enthaltenen Eiskeime ($\sim(1.3-1.7)\cdot 10^4$ pro Polle) vergleichbar, was wiederum durch die ähnlichen Signalflächen von #A und #B in den DSC-Thermogrammen bestätigt wird.

Tabelle 3.2: Maximale Anzahl aktiver Eiskeime in Birkenpollen bezogen auf die Anzahl Pollenkörner (n_n) und daraus berechnete Keimzahl pro eingesetzter Masse an Pollenkörnern (n_m) sowie Oberfläche der Pollen (n_s), wobei eine Dichte von 1 g cm^{-3} und ein Pollenradius von $12\text{ }\mu\text{m}$ angenommen wird.

$n_n(T)$ [pro Polle]	$n_m(T)$ [g^{-1}]	$n_s(T)$ [cm^{-2}]
$\sim 10^4$	$1.382\cdot 10^{12}$	$5.526\cdot 10^9$

Die Anwendbarkeit der auf der singulären Theorie basierenden kumulativen Keimspektren wird durch die gering ausgeprägte Stochastik der heterogenen Eisnukleation durch die Eiskeime aus den Birkenpollen in DSC-Experimenten (s. **Anhang A.11**) bekräftigt.

Möglicherweise gibt es einen Zusammenhang zwischen einerseits der geographischen Lage der Birkenpollen, wie der Unterschied zwischen den schwedischen und tschechischen Pollen zeigt (Augustin et al., 2013), und andererseits saisonaler Unterschiede, die die Produktion der Eiskeime beeinflussen. Im Gegensatz zu den zwei Eiskeime enthaltenen Birkenpollen #A und #C, die zu etwa derselben Zeit im Jahr 2011 gesammelt wurden, kommt in den zwei Jahre später gewachsenen Birkenpollen #B lediglich ein Eiskeim vor. Neben unterschiedlichen klimatischen Bedingungen könnten auch variierende Umwelteinflüsse durch zum Beispiel oxidative Substanzen in der Luft in Erwägung gezogen werden (Gute and Abbatt, 2018; Felgitsch et al., 2018). Die in **Abschnitt 3.1.3** dargestellten IR-Spektren deuten auf eine hohe Ähnlichkeit in den Strukturen der beiden Eiskeime hin, was mit einer (geringen) chemischen Modifikation erklärt werden könnte.

3.1.1.1 Einfluss gelöster Substanzen auf die Eisnukleationsaktivität

Um nähere Informationen bezüglich der Eigenschaften der molekularen Eisnukleatoren und deren aktiver Stelle zu erhalten, wurde der Einfluss auf die Nukleationsaktivität in verschiedenen wässrigen Lösungen untersucht. In **Abbildung 3.3** sind beispielhaft für einige Konzentrationen des hydrophilen organischen Moleküls

Glucose ($M = 180 \text{ g mol}^{-1}$) DSC-Thermogramme wässriger BPWW #A-Lösungen gezeigt. Die Abnahme der Signalintensitäten mit steigender Konzentration resultiert aus einer Abnahme des Wasseranteils in den wässrigen Tröpfchen und damit auch in der gesamten Emulsion. Sowohl bei den Nukleationssignalen der heterogenen als auch homogenen Nukleation ist ein klarer Trend zu erkennen, der eine Beeinflussung der aktiven Eisnukleatoren ausschließen lässt und durch die grauen Pfeile verdeutlicht wird.

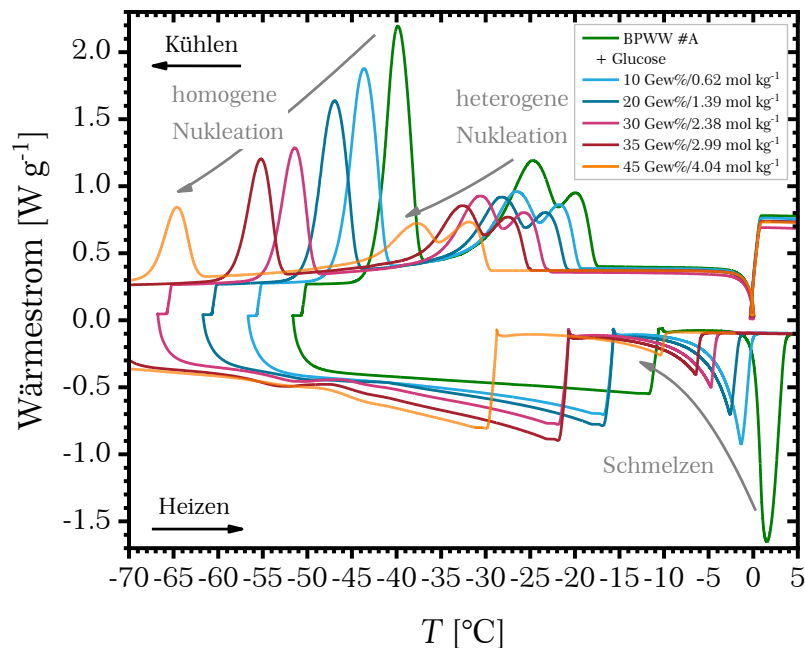


Abbildung 3.3: DSC-Thermogramme wässriger Lösungen von BPWW #A mit unterschiedlichen Sucrosekonzentrationen. Aufgrund des sinkenden Wasseranteils nehmen die Intensitäten der heterogenen und homogenen Nukleations- sowie der Schmelzsignale mit zunehmender Konzentration ab, deren Onsettemperaturen bzw. Wendepunkttemperaturen (Schmelzsignale; außer reines BPWW: Onset) sich durch die Gefrierpunkt- bzw. Schmelzpunktniedrigung zu tieferen Temperaturen verschieben. Die Kühlkurven wurden bei einer Rate von -5 °C min^{-1} gemessen, die Schmelzübergänge bei einer Heizrate von $+1 \text{ °C min}^{-1}$ erfasst.

Die Verschiebung der Nukleationssignale sowie der Schmelzkurven zu tieferen Temperaturen sind eine Folge der Gefrierpunktserniedrigung, wie sie in [Kapitel 2.1.4](#) beschrieben ist und in der [Abbildung 3.4a-c](#) in Abhängigkeit der Konzentration dargestellt ist. Werden die Phasenübergangstemperaturen als Funktion der Molalität (a)) oder des Massenbruchs (b)) aufgetragen, ist für verschiedene gelöste Substanzen (Glucose: Kreise; NaCl: Rauten; NaCl-Glucose-Gemisch: Vierecke) zwar der gleiche Trend auszumachen, allerdings in einem unterschiedlichen Ausmaß, was besonders bei den homogenen Nukleationstemperaturen zu beobachten ist. Darin äußert sich die Abhängigkeit der thermodynamischen Phasenübergangstemperatur nicht nur von der Anzahl, sondern auch von der Art des gelösten Stoffes. Wird nun die Wasseraktivität a_w als die Konzentration beschreibende Größe eingesetzt, fallen alle zu einem Phasenübergang gehörenden Datenpunkte zu einer einzigen Linie zusammen, die aus der wasseraktivitätsbasierten Eisnukleationstheorie von Koop et

al. (2000) sowie Koop und Zobrist (2009) folgt (**Gleichung (2.27)**). Damit bestätigt sich im Fall von Glucose, dass die Erniedrigung der heterogenen Nukleationstemperaturen aufgrund der klassischen Gefrierpunktniedrigung auftritt und nicht eine Folge einer Modifikation der Eiskeime ist.

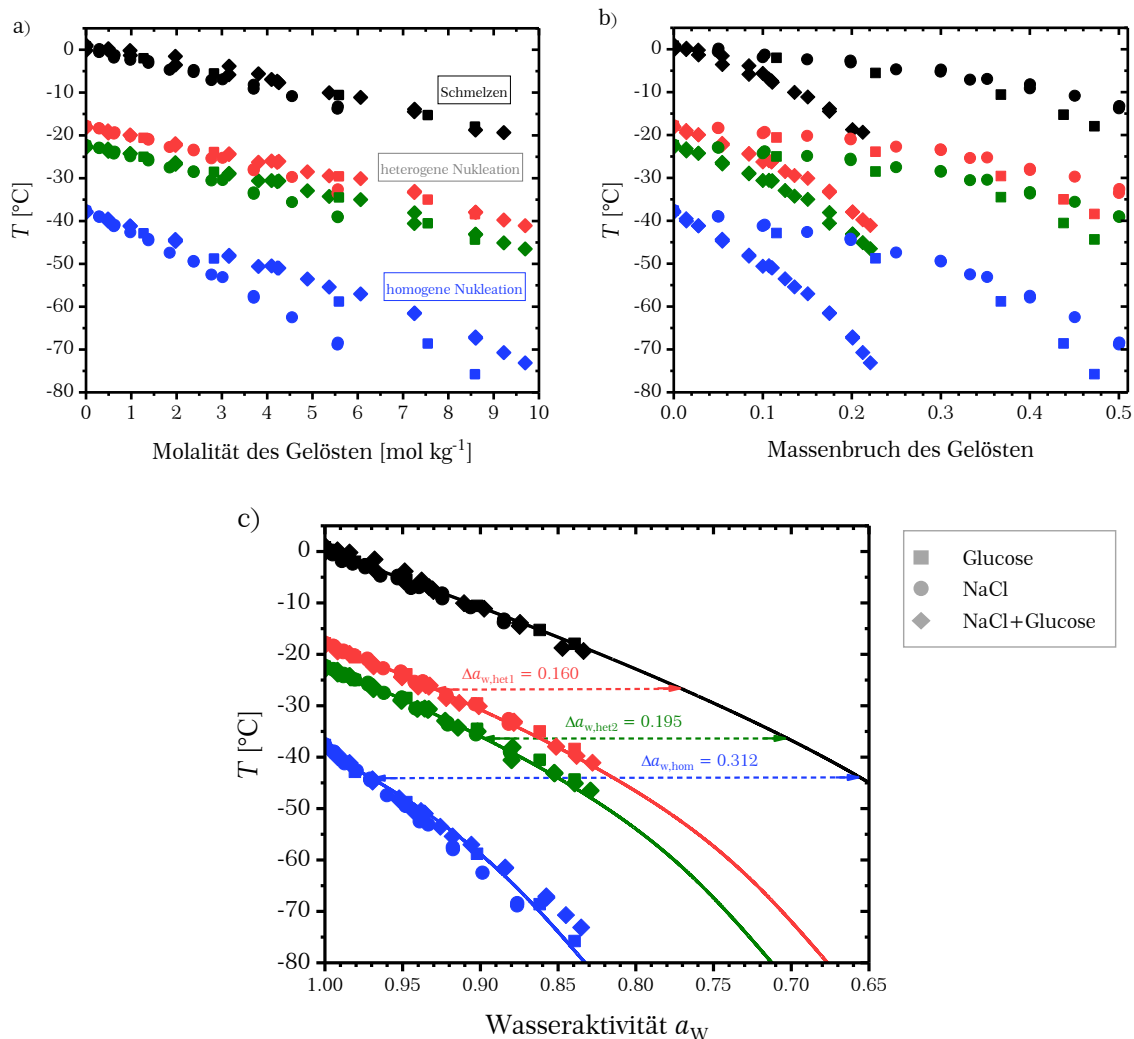


Abbildung 3.4: Phasendiagramme von BPWW #A-Lösungen mit Glucose (Vierecke), NaCl (Kreise) sowie einem NaCl-Glucose-Gemisch mit einem molaren Verhältnis von 1:2 (Rauten) als Funktion a) der Molalität, b) des Massenbruchs der gelösten Substanz(en) und c) der Wasseraktivität. Die heterogenen (rot) sowie homogenen (blau) Nukleationstemperaturen entsprechen den Onsettemperaturen bei einer Kühlrate von -5 °C min^{-1} , die Schmelztemperaturen (schwarz) wurden bei einer Heizrate von $+1 \text{ °C min}^{-1}$ bzw. $+5 \text{ °C min}^{-1}$ (NaCl) erfasst. Zur Auswertung der Nukleationstemperaturen des zweiten heterogenen Eiskeims (grün) wurde der Knickpunkt der beiden sich überlagernden Signale herangezogen. Die Schmelztemperaturen der verdünnten Lösungen wurden über die Onsettemperaturen ausgewertet, bei höheren Konzentrationen wurde der Wendepunkt herangezogen. Die schwarze Schmelzpunktlinie in c) wurde aus Zobrist (2009) entnommen (**Gleichung (2.27)**). Die anderen drei Linien für die weiteren Phasenübergänge wurden über eine horizontale Verschiebung um den charakteristischen Wert Δa_w , der aus einer Anpassung mit **Gleichung (2.27)** erhalten wurde, berechnet. Die Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität wurde für die Glucose- und NaCl-Lösungen unter Nutzung der Parametrisierungen (2.28) und (2.29) und der Koeffizienten a - g (Tabelle 3.4) berücksichtigt.

Die Phasengrenzlinien für die heterogenen (rot und grün) und homogenen (blau) Nukleationen wurden durch horizontale Verschiebung der Schmelzkpunktkurve (schwarz) um einen charakteristischen Wert Δa_w (Tabelle 3.3) zu höheren Wasseraktivitäten erhalten, indem die Parametrisierung (2.27) mit der Ergänzung des freien Parameters Δa_w als Fitfunktion auf die Datenpunkte angewandt wurde. Aus der Nicht-Linearität der $T(a_w)$ -Kurve folgt auch die stärkere Temperaturabhängigkeit der Gefrierpunktserniedrigung bei der homogenen Nukleation.

Tabelle 3.3: Horizontale Verschiebungen der drei Gefrierkurven für BPWW #A relativ zu der Schmelzkpunktkurve aus Koop und Zobrist (2009).

$\Delta a_{w,het1}$	$\Delta a_{w,het2}$	$\Delta a_{w,hom}$
0.159	0.195	0.312

Die Wasseraktivitäten der Glucose-Lösungen wurden über die Parametrisierungen (2.28) und (2.29) mit den Koeffizienten $a-g$ (Tabelle 3.4) aus Zobrist et al. (2008a) erhalten. Die a_w -Werte der NaCl-Lösungen wurden aus einem Modell (Aerosol Inorganics Model, 2014) unter Nutzung derselben Parametrisierungen zur Extrapolation über den gesamten Konzentrations- und Temperaturbereich berechnet. Leichte Abweichungen der Datenpunkte von der theoretischen Phasenübergangslinie können mit Ungenauigkeiten bei der Bestimmung der Wasseraktivitäten erklärt werden, da die Koeffizienten $a-g$ sowohl für die Glucose- als auch für NaCl-Lösungen aus einer Temperaturextrapolation zu niedrigeren Temperaturen unterhalb des eigentlichen Gültigkeitsbereich von +16 °C bzw. -30 °C resultieren. Die a_w -Werte für die binären NaCl-Glucose-Mischungen wurden über die gemessenen DSC-Schmelzpunkte aus der Parametrisierung (2.27) von Koop und Zobrist (2009) abgeleitet und die Temperaturabhängigkeit als vernachlässigbar angenommen. Diese Annahme wird durch die gute Beschreibung der Datenpunkte (Rauten) durch die Parametrisierungen bestätigt und liegt in der sich in dem Gemisch aufhebenden gegenläufigen Temperaturabhängigkeit begründet.

Tabelle 3.4: Koeffizienten für die Parametrisierungen (2.28) und (2.29) der Wasseraktivität von wässrigen Glucose- und NaCl-Lösungen. Der Gültigkeitsbereich liegt für die Glucoselösungen zwischen +16 °C und +40 °C sowie einem Massenbruch w_2 des Gelösten von 0-0.45 (Zobrist et al., 2008a). Die Parametrisierungen sind für NaCl-Lösungen mit $w_2 = 0 - 0.23$ im Temperaturbereich zwischen -30 °C und +20 °C anwendbar, werden aber in beiden Fällen zu tieferen Temperaturen extrapoliert.

	a	b	c	d	e	f	g
Glucose	-1	-0.91879	0.082547	$4.3113 \cdot 10^{-4}$	$-5.7258 \cdot 10^{-5}$	$-3.7372 \cdot 10^{-4}$	0
NaCl	-2.14909	-1.60295	-0.01239	$9.01426 \cdot 10^{-4}$	-0.0373	0.21138	-0.37088

Einfluss von Guanidiniumchlorid und NaCl

Während die organische Verbindung Glucose die Nukleationsaktivität der Eisnukleatoren in Birkenpollen nicht beeinflusst, wird in wässrigen Lösungen der Salze Natriumchlorid (NaCl; 58.44 g mol^{-1}) und Guanidiniumchlorid (GdmCl;

95.53 g mol⁻¹; Stank (2018)) eine abweichende Beobachtung gemacht (**Abbildung 3.5**). Auch bei geringeren Massenprozenten wird die Intensität der heterogenen Nukleationssignale deutlich stärker reduziert im Vergleich zu reinem BPWW als in der entsprechenden Glucoselösung. Zudem nimmt das homogene Nukleationssignal nicht kontinuierlich mit steigendem Anteil an Gelöstem ab. Diese Beobachtungen deuten auf eine teilweise und mit steigendem Anteil an gelöstem Salz zunehmende Inaktivierung der Eiskeime hin, weshalb die erwartete Signalverringerung durch eine Zunahme an homogen nukleierenden Tropfen aufgehoben wird. Erst bei höheren Konzentrationen an Salz ist eine Abnahme der Intensität des homogenen Gefriersignals zu erkennen. Die Verschiebungen der Nukleationstemperaturen sind auch hier analog zu den Glucoselösungen mit der Gefrierpunktserniedrigung zu erklären (GdmCl: s. **Tabelle 3.5**; NaCl: s. **Abbildung 3.4**).

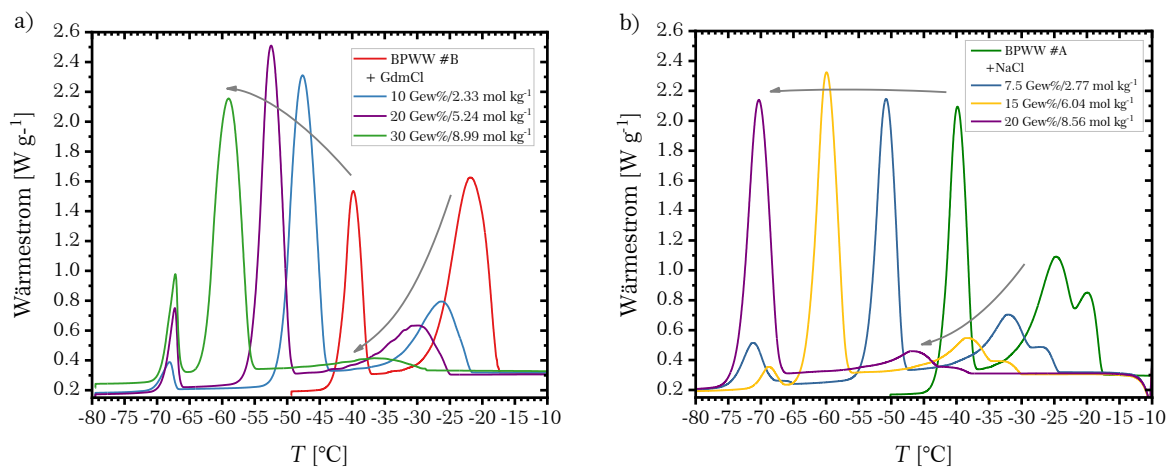


Abbildung 3.5: Abkühlkurven (-5 °C min^{-1}) der DSC-Thermogramme von a) BPWW #B und GdmCl (Stank, 2018) sowie b) BPWW #A und NaCl. Mit zunehmender Konzentration des Gelösten nimmt erwartungsgemäß die Intensität der heterogenen Signale ab, jedoch nicht die der homogenen Signale, was auf eine Inaktivierung der Eiskeime hindeutet, sodass mehr Tropfen homogen gefrieren. Die angegebenen Molalitäten beziehen sich auf die Gesamtanzahl an Ionen ($i=2$). Die kleinen Signale um -70 °C entstammen eutektischen Übergängen der Salz-Wasser-Gemische.

Die teilweise Inaktivierung der molekularen Eisnukleatoren aus den Birkenpollen durch ionische Substanzen deutet auf eine Zerstörung der Tertiärstruktur und einen damit einhergehenden Verlust der eisähnlichen Eigenschaft der Hydrathülle der aktiven Stelle hin. Guanidiniumchlorid ist als ein im biologischen Fachbereich üblicherweise verwendetes Denaturierungsreagenz bekannt, das in der hohen Konzentration von 6 M alle Proteine zu einem beträchtlichen Anteil ausfällt. Es ist jedoch mehr als fraglich, ob die Denaturierung ein Alleinstellungsmerkmal von Proteinen ist und nicht die Tertiärstruktur sämtlicher organischer Polymere durch die Anwesenheit beliebiger Ionen zerstört wird, da auch nicht-proteinbasierte Eisnukleatoren durch das Salz GdmCl inaktiviert werden können wie am Beispiel der organischen Komplexverbindung Trihydroxybenzol (Stank, 2018) und der Birkenpollenmakromoleküle, die in dieser Arbeit als Polysaccharide identifiziert wurden (**Kapitel 3.1.3**), gezeigt werden konnte.

In einer früheren Studie von Pummer et al. (2012) konnte kein Einfluss von Guanidiniumchlorid auf die Nukleationsaktivität von BPWW beobachtet werden, woraus ein Protein als Eisnukleator ausgeschlossen wurde. Hierbei kommt allerdings die Frage auf, warum in deren optischem Emulsions-Gefrierexperiment in der 6 molaren GdmCl-Lösung des Birkenpollenwaschwassers nur eine geringe Gefrierpunktserniedrigung von 3 °C (Pummer et al., 2012) oder 16 °C (Pummer, 2013), in der reinen 6 M GdmCl-Lösung von nur 14 °C detektiert wurde: eine 6 M GdmCl-Lösung weist einen in DSC-Experimenten nicht mehr erfassbaren Schmelzpunkt, sondern einen eutektischen Übergang bei -24 °C und ein exothermes Signal beim Abkühlen bei -70 °C auf (Stank, 2018). Selbst eine 30 Gew%-ige Lösung weist eine ausgeprägtere (homogene) Gefrierpunktserniedrigung von ~18 °C auf (**Tabelle 3.5**). Somit hätten in den Messungen von Pummer et al. (2012) keine Nukleationsereignisse bei -3 °C bzw. -16 °C beobachtet werden können und deren Argument gegen ein Protein als Eisnukleator ist hinfällig.

Tabelle 3.5: Nukleationstemperaturen (Onset) sowie Schmelztemperaturen (reines Wasser und BPWW: Onset; Lösung: Wendepunkt) von BPWW #B-Lösungen mit variierender Konzentration an GdmCl sowie von reinen GdmCl-Lösungen. Erkennbar sind die vergleichbaren Temperaturen bei gleicher Konzentration. Etwaige Abweichungen resultieren aus Konzentrationsfehlern. Kühlrate -5 °C min⁻¹, Heizrate +1 °C min⁻¹. n.g. = nicht gemessen.

	T_m [°C]	T_m [°C]	T_{het} [°C]	T_{het} [°C]	T_{hom} [°C]	T_{hom} [°C]
GdmCl [Gew%]	BPWW #B + GdmCl	GdmCl	BPWW #B + GdmCl	GdmCl	BPWW #B + GdmCl	GdmCl
0	-0.1	-0.1	-17.8	--	-37.6	-37.2
10	-3.4	-3.3	-21.8	--	-44.2	-43.3
20	-6.9	n.g.	-25.1	--	-49.6	n.g.
30	-10.8	-10.7	-28.3	--	-55.7	-55.0

Einfluss von Borat und pH-Wert

Die bisher dargelegten Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung der molekularen Eisnukleatoren zeigen aufgrund der Inaktivierung der Eiskeime in Anwesenheit von Salzen durch vermutete Denaturierung die Polymereigenschaft an. Informationen bezüglich der chemischen Substanzklasse konnten dagegen nicht erhalten werden, weshalb weiterführende Experimente durchgeführt wurden, deren Ergebnisse in **Abbildung 3.6** gezeigt sind.

Zugabe von Borat (grün) zu einer sehr verdünnten IAP2 #C-Lösung (blau) bis zur Sättigung (~50 mg ml⁻¹ (5 Gew%); ~0.1 M) und Reaktion bei Raumtemperatur über Nacht löscht die Nukleationsaktivität der Eiskeime vollständig aus (a)), woraus auf die Existenz mehrerer Hydroxylgruppen in dem Eiskeim geschlossen werden kann. Der geringe Massenanteil des Borats verringert die Wassermenge in der Emulsion nicht bedeutend, sodass die Reduktion des Nukleationssignals nicht darauf zurückzuführen ist. Die Hydroxylgruppen könnten entweder direkt an der Eisnukleation beteiligt sein oder durch die Komplexbildung eine strukturelle Änderung des Moleküls hervorrufen,

sodass die Hydratwassermoleküle der aktiven Stelle eine nicht mehr dem Eiskristall entsprechende Anordnung besitzen. Demzufolge können die molekularen Eisnukleatoren entweder ein Polysaccharid, wie auch von Pummer et al. (2012) vermutet wurde, oder ein Glykoprotein sein. Die Resistenzen gegenüber Amylase und Cellulase, die in dieser Arbeit bestätigt werden konnten (Daten nicht gezeigt) müssen ein Polysaccharid als Eiskeim nicht ausschließen, da diese spezifisch nur die $\alpha(1\rightarrow4)$ - und $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidischen Bindungen spalten. Dagegen könnte die von Pummer et al. (2012) beobachtete Unempfindlichkeit auf Proteasen trotzdem mit einem Protein in Zusammenhang gebracht werden, da die Zuckergruppen eines Glykoproteins durchaus als Schutzschicht des Moleküls fungieren können.

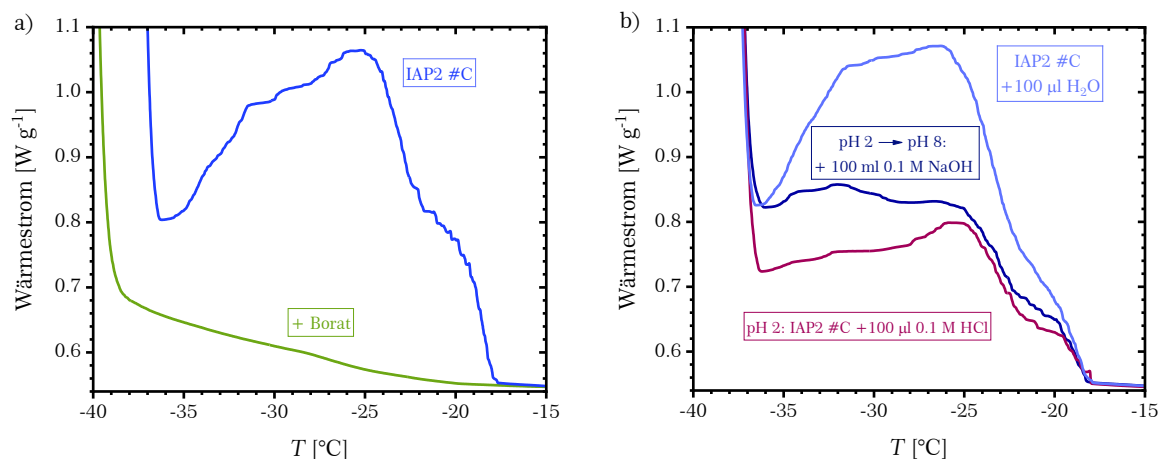


Abbildung 3.6: Ausschnitte aus den DSC-Thermogrammen von BPWW #C (blau) a) mit Borat versetzt und b) über Ansäuerung mit HCl auf pH2 (weinrot) gebracht und anschließend auf pH8 reneutralisiert (dunkelblau). Während Borat die Nukleationsaktivität vollständig entfernt, wird sie im sauren Milieu nur zu einem Anteil reduziert und ist nicht mehr zu regenerieren.

Die Variation des pH-Wertes der Lösung (b)) in das saure Milieu durch Zugabe von 0.1 M HCl (pH 2; weinrot) verringert die Signalintensität des heterogenen Nukleationssignals, aber nicht dessen Onsettemperatur und Signalform, was auf eine teilweise Inaktivierung der Eiskeime hindeutet, während die noch aktiven Eisnukleatoren nicht beeinflusst werden. Eine erneute Neutralisierung (pH 8; dunkelblau) mit der gleichen Menge 0.1 M NaOH führt lediglich zu einer moderaten Änderung des Nukleationssignals bei Temperaturen unterhalb von -27 °C , jedoch nicht zur vollständigen Regenerierung der Eiskeime. Die Experimente deuten darauf hin, dass die Aktivität der Eiskeime durch die bei einem pH-Wert von 2 stattfindende Protonierung der anionischen, sauren Gruppen kaum beeinflusst wird und daher entweder diese nicht der aktiven Stelle angehören oder die Struktur des Moleküls nicht entscheidend beeinträchtigt wird. Dagegen könnte der irreversible, teilweise Verlust der Nukleationsaktivität mit der säurekatalysierten Hydrolyse erklärt werden.

Eine detailliertere Diskussion bezüglich der chemischen Identität der molekularen Eisnukleatoren wird in **Kapitel 3.1.3** bei der Auswertung der IR-Spektren gegeben.

3.1.2. Antigefrieraktivität von Makromolekülen aus Birkenpollen

Anhand der Birkenpollen soll der Frage einer dualen Funktion von molekularen Eiskernkeimern nachgegangen werden. Weisen die eiskernkeimenden Moleküle der Birkenpollen ebenso Antigefriereigenschaften auf? Vor allem in neueren Modellierungen konnte gezeigt werden, dass Eiskernkeime und Antigefrierer-Moleküle nicht nur strukturell ähnliche aktive Stellen aufweisen, sondern besonders über eine geordnete Hydrathülle mit Eis wechselwirken können (Garnham et al., 2011a; Garnham et al., 2011b; Pandey et al., 2016; Hudait et al., 2018b). Warum sollte daher ein Molekül, das an seiner aktiven Stelle einen neuen Eiskern zu bilden vermag, nicht auch in der Lage sein, an einen bestehenden Eiskristall zu adsorbieren?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden erste Eisstrukturierungsmessungen am über Verdampfung von Wasser bei $+90\text{ °C}$ aufkonzentrierten Waschwasser der Birkenpollen #A als 30 Gew%-ige Sucroselösung durchgeführt. Ein bei einer Rate von -0.01 °C min^{-1} wachsender Eiskristall geht aus einer anfänglich hexagonalen in eine blümchenähnliche Form über (**Abbildung 3.7**), was auf eine Antigefrieraktivität von Molekülen aus den Birkenpollen hindeutet. Dieses Experiment zeigt außerdem eine gewisse Hitzebeständigkeit der Antigefrierer-Moleküle auf, wie sie auch für die Eiskernkeime beobachtet wurde (Pummer et al., 2012). Um einen Einfluss der Viskosität des Mediums, das aus einer Mischung des Waschwassers und der zusätzlich gelösten Sucrose besteht, auf die Eiskristallform durch dendritisches Wachstum auszuschließen, wurde eine Messung mit einer Sucroselösung bei einem ähnlichen Schmelzpunkt durchgeführt. Diese zeigt nur eine leicht unrunde Struktur des gewachsenen Eiskristalls zeigt. Dabei ist zu beachten, dass der Schmelzpunkt aufgrund der unterschiedlichen Medien nicht direkt mit der Viskosität korreliert.

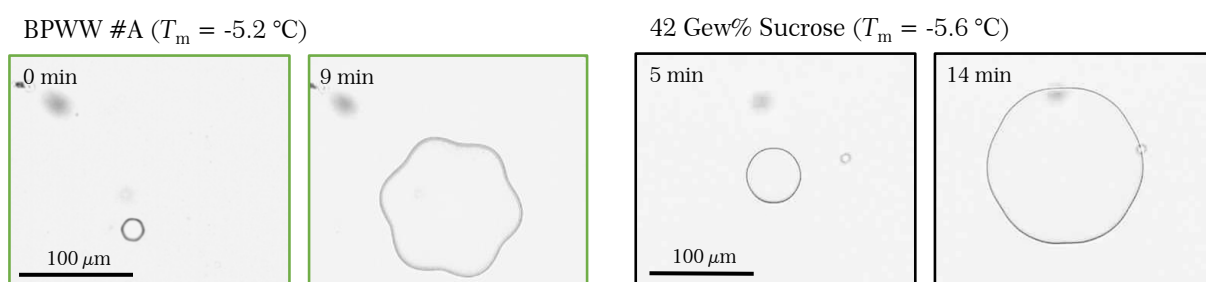


Abbildung 3.7: Eisstrukturierungsexperimente mit einer Rate von -0.01 °C min^{-1} von a) einer bei $+90\text{ °C}$ aufkonzentrierten Birkenpollenwaschwasserprobe #A (+ 30 Gew% Sucrose) und b) einer 42 Gew%-igen Sucroselösung mit demselben Schmelzpunkt als Referenzlösung.

Dieses Ergebnis gab den Anstoß für weiterführende Eisstrukturierungs- und Eiskristallisationsinhibierungsexperimente zur Erfassung der Antigefrieraktivität der Birkenpollen. Um eine möglichst saubere Probe mit einer geringeren Tendenz zur Alterung zu erhalten und Einflüsse des unbekanntes Waschwassermediums zu verringern, wurde die Probe zunächst über die für eisbindende Moleküle spezifische Eisaffinitätsaufreinigung (IAP) aufbereitet. Dazu wurde eine große Menge an Birkenpollen #B (100 g) in insgesamt 500 ml bidestilliertem Wasser suspendiert und das bei der Filtration durch einen 5 µm -CN-Membranfilter erhaltene braune

Waschwasser (**Abbildung 3.8**) der Aufreinigungsprozedur unterzogen. Die im ersten Schritt erhaltene Fraktion (b)) weist eine geringere Färbung als das ursprüngliche Waschwasser auf, die nach einem zweiten Aufreinigungsschritt deutlich reduziert ist (c)). Eine Untersuchung der Lösungen mittels UV-VIS-Spektroskopie (**Abbildung A.14**) zeigt eine kontinuierliche Abnahme der zwei Maxima bei 260 nm und 353 nm, was auf einen gleichmäßigen Ausschluss der bei diesen Wellenlängen absorbierenden Spezies hindeutet (**Tabelle A.4**). Dieses lässt vermuten, dass die eisbindenden Moleküle nicht zu der Molekülklasse der DNA oder Proteine, die typischerweise bei 260 nm bzw. 280 nm absorbieren, gehören und dass der zur der Färbung des Waschwassers beitragende Farbstoff ($\lambda_{\text{max}} = 353 \text{ nm}$) ebenso keine eisbindenden Eigenschaften aufweist. Auch anhand der Transparenz der Eisfraktion der im folgenden IAP 2 genannten zweimal gereinigten Probe ist zu vermuten, dass keine erkennbaren Einschlüsse von farbigen Verunreinigungen mehr vorhanden sind. Nicht eisbindende Moleküle wurden somit durch das langsame Wachstum bei Kühlraten von -0.05 bis -0.1 °C h^{-1} ausgeschlossen. Anschließend Messungen sollen klären, ob dagegen eisbindende Moleküle in das Eis eingeschlossen wurden.

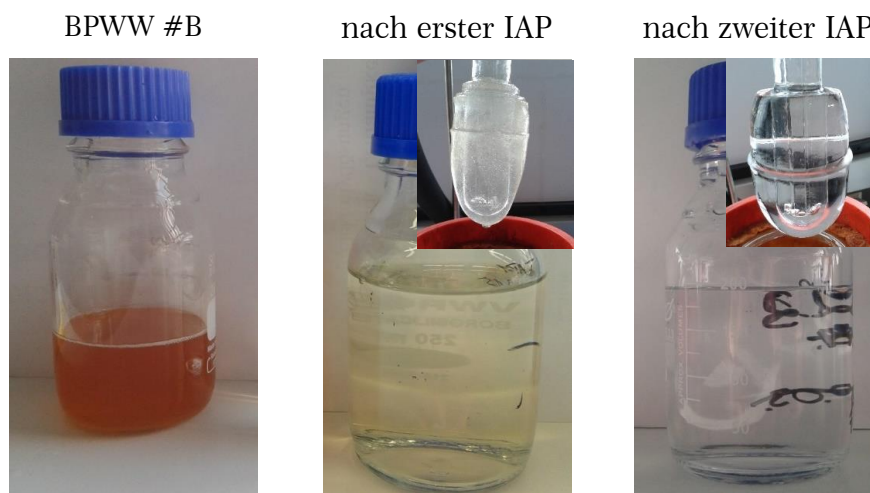


Abbildung 3.8: Fotografien der BPWW #B-Lösung vor der Aufreinigung (links), der einmal (Mitte) und zweimal (rechts) aufgereinigten Probe. Eingeklinkt sind jeweils die Eisfraktionen vor dem Schmelzen der Lösungen, die in der größeren Darstellung gezeigt sind. Eine Abnahme der farbigen Verunreinigungen durch die Aufreinigung ist deutlich erkennbar.

Zunächst wurde die Eisnukleationsaktivität mittels DSC-Messungen überprüft (**Abbildung 3.9**). In den aufgereinigten Proben des ersten (IAP 1; violett) und zweiten Schrittes (IAP 2; orange) ist der bei -18 °C nukleierende Eisnukleator tatsächlich noch vorhanden, dessen Konzentration nimmt jedoch mit steigender Aufreinigungsstufe ab. Dieses ist damit erklärbar, dass die extrahierte Fraktion nur einem Teil der Anfangslösung entspricht und möglicherweise Luftfeuchtigkeit an dem Eisblock kondensiert ist, wodurch die Lösung zusätzlich verdünnt wurde. Möglich wäre auch eine schwächere Eisbindungsaffinität des Eisnukleators, sodass dieser zu einem geringeren Maße in den Eisblock eingebaut wurde. Nichtsdestotrotz zeigt sich die eisbindende Eigenschaft des eisnukleierenden Moleküls.

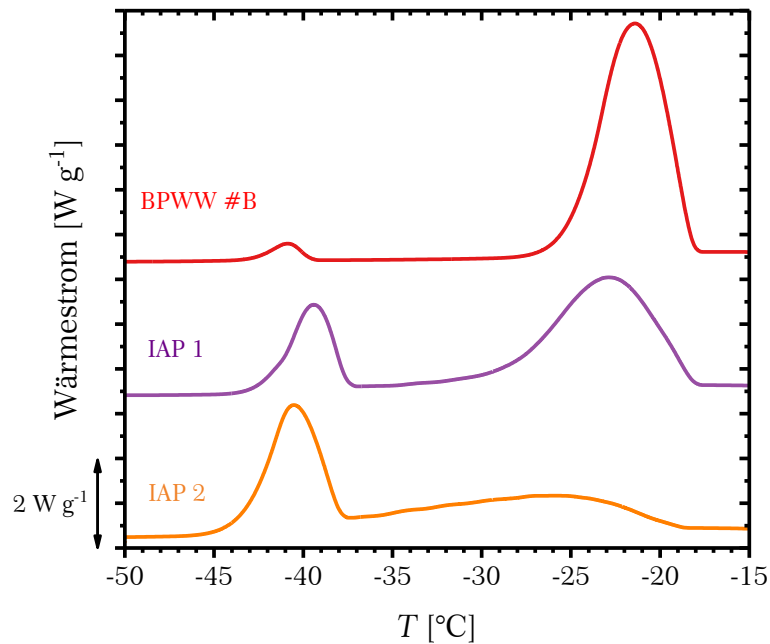


Abbildung 3.9: DSC-Messungen der Waschwasserprobe #B vor (rot) sowie nach einmaliger (violett; IAP 1) und zweimaliger (orange; IAP 2) Aufreinigung bei einer Kühlrate von $-5 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Die Konzentration des Eiskeimes nimmt mit der Anzahl an Aufreinigungszyklen ab, was entweder mit einer geringeren Eisaffinität oder mit einer verdünnteren Lösung im Zusammenhang steht.

Die Anwesenheit von eisbindenden Molekülen in der aufgereinigten und am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und vermindertem Druck aufkonzentrierten IAP 2-Probe wird in der aus einer Eisstrukturierungsmessung entnommenen Bildsequenz ([Abbildung 3.10](#)) aufgezeigt. Der wachsende Eiskristall bildet zunächst eine Sternform (Bild 2) aus, bis er bei weiterem Wachstum in eine Blütenform übergeht. Diese Strukturierung deutet auf eine Adsorption der Moleküle an die sekundäre prismatische Fläche hin und konnte in früheren Studien (Yaish et al., 2006; Gupta, R. and Deswal, R., 2014b) in Lösungen von AFPs aus Pflanzen beobachtet werden.

3.1.2.1 Eisstrukturierung an IAP 2 #B

Der mit dem einer reinen 30 Gew%-igen Lösung ($T_m = -3.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) vergleichbare Schmelzpunkt der IAP 2 #B-Sucrose-Lösung von $-3.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zeigt die Sauberkeit der IAP 2-Probe bezüglich nicht eisbindender, gefrierpunktserniedrigender Substanzen auf, wie es in der nicht aufgereinigten BPWW #A-Probe der Fall ist. Dagegen wurden eisbindende Moleküle spezifisch aus dem Waschwasser extrahiert, sodass eine sehr starke Eisstrukturierung zu detektieren ist. Diese Ergebnisse, die eine Antieisaktivität der Birkenpollenmoleküle zeigen, konnten anhand eines wiederholten Experimentes an BPWW #C nach ebenfalls erfolgter Aufreinigungsprozedur bestätigt werden (Wiehemeier, 2015).

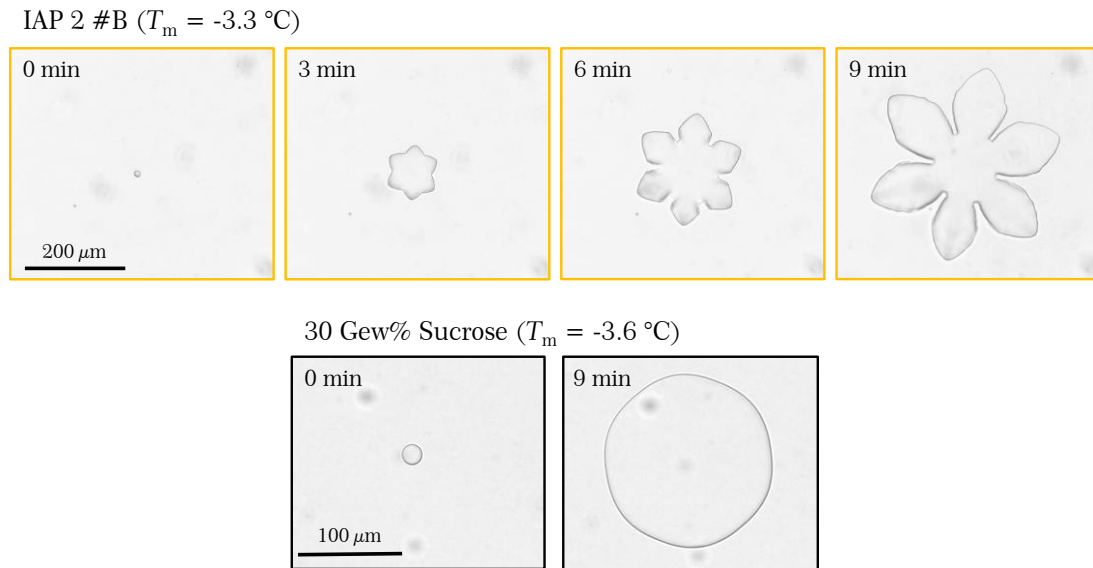


Abbildung 3.10: a) Bildsequenz aus einer Eisstrukturierungsmessung (Kühlrate -0.01 °C min^{-1}) mit der zweimal aufgereinigten IAP-Probe #B als 30 Gew%-ige Sucrose-Lösung zeigt deutlichen eisbindenden Charakter der Moleküle in der Lösung, die durch spezifische Adsorption an die sekundäre prismatische Fläche dem Eiskristall eine blümchenähnliche Form geben. b) Eine 30 Gew%-ige Sucroselösung als Referenzmessung zeigt lediglich eine etwas unrunde Form aufgrund leichten dendritischen Wachstums bei Erreichen einer mittleren Größe des Kristalls.

3.1.2.2 Eisrekristallisationsinhibierung an IAP 2 #B

Da für die Inhibierung der Eisrekristallisation (IRI) eine weitaus höhere Konzentration notwendig als für die Eisstrukturierung, ist die IRI-Aktivität folglich weniger stark ausgeprägt. In **Abbildung 3.11a** sind die zeitlichen Verläufe der mittleren kubischen Radien r^3 in den polykristallinen Eisfilmen einer 45 Gew%-igen Sucroselösung (schwarz) als Referenz und der IAP 2 #B-Lösung in diesem Medium (orange) dargestellt. Eine Verlangsamung der Ostwald-Reifung in der IAP 2-Probe ist deutlich, aber eine vollständige Inhibierung findet auch bei maximaler Konzentration (100 %; orange) nicht statt. Dementsprechend ist der Unterschied der Kristallgrößen nach 120 min Haltezeit bei -8 °C auf den aufgenommenen Bildern für verschiedene Konzentrationen an IAP 2-Probe schwieriger zu erkennen (**Abbildung 3.11b**). Die Reduzierung der Ostwald-Reifung lässt sich an der Bildung weniger größerer Kristalle und dem Verbleiben mehr kleinerer Kristalle ausmachen. Desweiteren weist auch hier die Strukturierung der Eiskristalle auf eine Adsorption von Molekülen hin, die für die Eisrekristallisationsinhibierung verantwortlich sind.

Dieses IRI-Experiment wurde für drei weitere, verdünnte Proben durchgeführt, sodass über die Konzentrationsabhängigkeit der auf den Eisanteil korrigierten wachstumsinhibierten Ratenkonstanten k_{10} , die sich gemäß der LSW-Theorie (**2.35**) aus den Steigungen der linearen $r^3(t)$ -Verläufe und anschließender Verwendung der **Gleichungen (2.37)** und **(2.40)** ergeben (genauere Beschreibung s. **Anhang A.2**), eine effiziente Konzentration c_i aus einer Anpassung mit der sigmoidalen Hillfunktion (**2.41**) ermittelt werden kann (**Abbildung 3.12**).

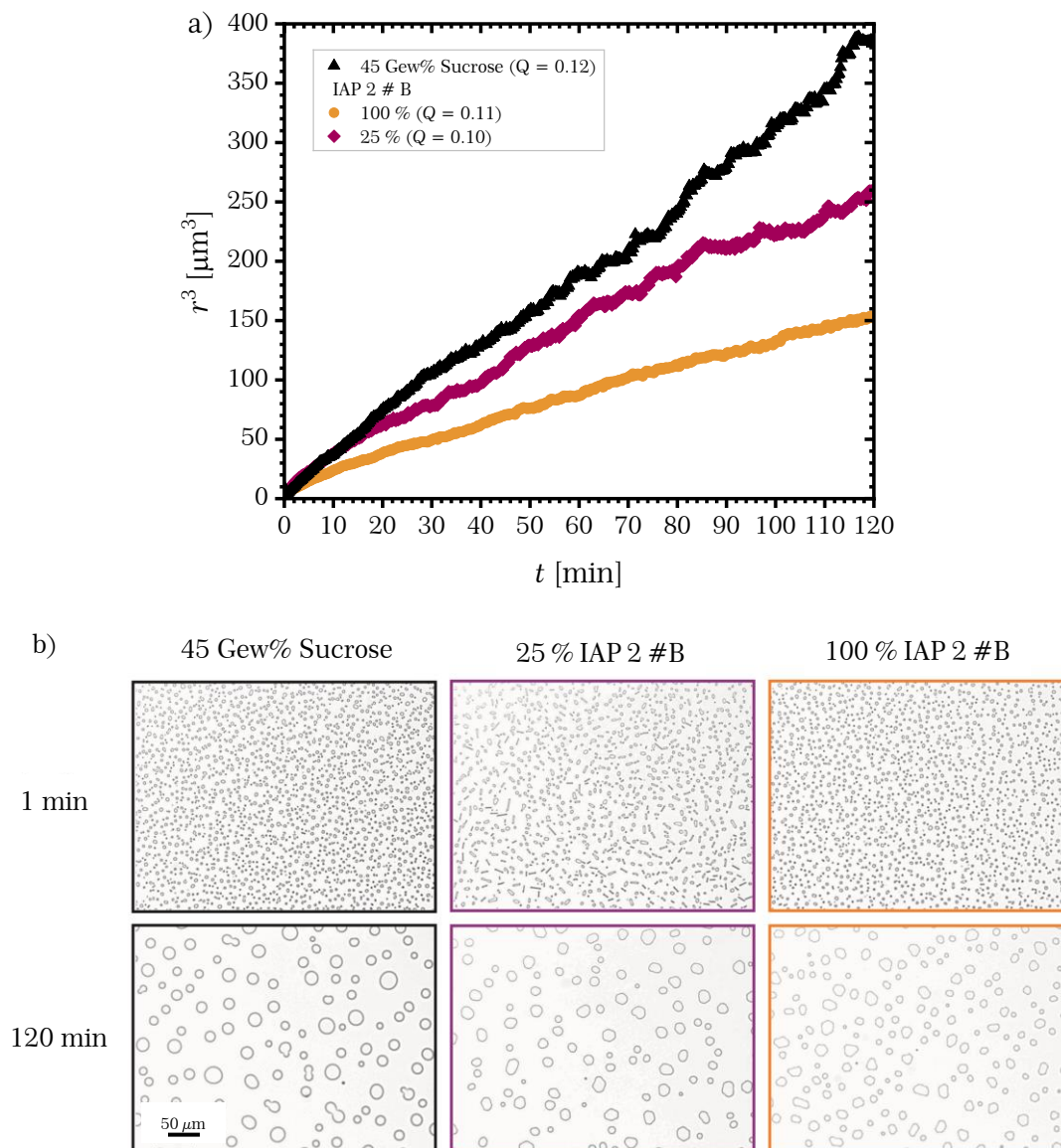


Abbildung 3.11: a) Linearer Verlauf des kubischen mittleren Radius r^3 mit der Zeit bei der Haltetemperatur $-8\text{ }^\circ\text{C}$ von verschiedenen konzentrierten IAP 2 #B-Proben. Die Steigungen der Kurven ergeben die diffusionslimitierte Ratenkonstante k_d für die Referenzmessung in 45 Gew%-iger Sucroselösung (schwarz) bzw. die kleineren, wachstumsinhibierten Ratenkonstanten k_i für die Probenmessungen mit der IAP 2-Stammlösung (100%, orange) sowie einer verdünnten Lösung (25 %; dunkelrot). b) Eine Verlangsamung der Ostwald-Reifung ist auch in den Bildausschnitten der Messungen erkennbar, da mit steigender Konzentration an eisbindenden Molekülen mehr kleine und verstärkt strukturierte Kristalle nach 120 min Haltezeit verbleiben.

Diese Konzentration ist ein Charakteristikum für die IRI-Aktivität eines Antiefrörmoleküls und entspricht der Konzentration, bei der die Ratenkonstante relativ zu der diffusionslimitierten Ratenkonstante k_{d0} des Mediums auf den halben Wert abgesunken ist. Sie kann, wenn die Konzentration logarithmisch skaliert wird, aus dem Wendepunkt der Anpassungskurve entnommen werden. Dabei wird der für die einzelnen Sucrose-Referenzmessungen über **Gleichung (2.40)** berechnete k_{d0} -Wert von $1.001\text{ }\mu\text{m}^3\text{ min}^{-1}$ festgesetzt. Die Anpassung erfolgt an die einzelnen Datenpunkte (offene Symbole) statt der Mittelwerte (geschlossene Symbole), um die Streuung

besser widerzugeben. Da in diesem Fall keine Informationen über die Konzentration in der IAP 2-Stammlösung vorliegen, werden die Konzentrationen über den Verdünnungsfaktor angegeben. Es ergibt sich ein c_i von 0.713 ± 0.463 , was bei einer angenommenen Dichte der verdünnten Lösung von 1 g cm^{-3} einer Masse der eisbindenden Moleküle von 71.3 % bezüglich der in der Stammlösung (Verdünnungsfaktor 1) entspricht.

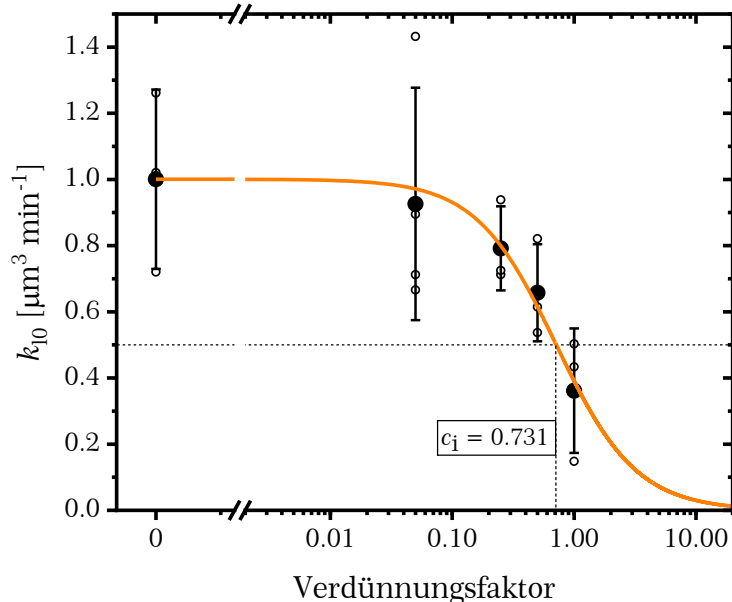


Abbildung 3.12: Die Konzentrationsabhängigkeit der auf einen Eisanteil von Null korrigierten Ratenkonstanten k_{10} von IAP 2 #B kann mithilfe einer sigmoidalen Fitfunktion (2.41) angepasst und ausgewertet werden. Es ergibt sich aus dem Wendepunkt die charakteristische effiziente Konzentration $c_i = 0.731$, wobei dieser Wert den Anteil an eisbindenden Molekülen relativ zur Stammlösung (Verdünnungsfaktor 1) wiedergibt.

Durch Vergleich der Verdünnungsfaktoren bei Erreichen der Plateaus in den kumulativen Keimspektren einer BPWW #B-Messreihe mit bekannter Ausgangskonzentration und einer Verdünnungsreihe der IAP 2-Probe lässt sich die Konzentration der eisnukleierenden Moleküle abschätzen. Demnach liegt die Konzentration an Eiskeimen in der IAP 2-Stammlösung bei etwa $700 \pm 200 \text{ mg Pollen pro ml Lösung}$. Mit $n_m(T)_{\max} = 1.382 \cdot 10^{12} \text{ g}^{-1}$ (Tabelle 3.2) und einem angenommenen Molekulargewicht der Eisnukleatoren von minimal 100 kDa (s. Abschnitt 3.1.3.1) entspricht das einer molaren Konzentration der eisnukleierenden Moleküle von $1.604 \pm 0.458 \text{ nmol l}^{-1}$ bzw. einer Massenkonzentration von $0.160 \pm 0.046 \text{ µg ml}^{-1}$. Aufgrund des Massenanteils von 45 % Sucrose verringert sich deren Konzentration in der IRI-Probe auf $1.062 \pm 0.303 \text{ nmol l}^{-1}$ ($0.106 \pm 0.030 \text{ µg ml}^{-1}$). Die Berechnung der Konzentration erfolgt mithilfe der Dichte ρ_{Sucrose} einer 45 Gew%-igen Sucroselösung (Gleichung (A.4); 1.202 g ml^{-1}).

In Kapitel 3.1.3 wird anhand der IR-Spektren ein molares Verhältnis der eisnukleierenden zu eisbindenden Molekülen von weniger als 0.1 abgeleitet, sodass die Konzentration der eisbindenden Moleküle in der IAP-Probe mindestens $10.624 \pm 3.035 \text{ nmol l}^{-1}$ ($1.062 \pm 0.304 \text{ µg ml}^{-1}$) beträgt und damit deren effektive

Konzentration $c_i > 7.575 \pm 4.919 \text{ nmol l}^{-1}$ ($0.758 \pm 0.492 \mu\text{g ml}^{-1}$) beträgt (**Tabelle 3.6**). Diese Werte liegen damit in der sehr effektiven Konzentrationsregion und sind vergleichbar mit den sehr aktiven AFGPs ($c_i = 10^{-3}$ - $10^{-1} \mu\text{mol l}^{-1}$ bzw. 10^{-2} - $10^{-1} \mu\text{g ml}^{-1}$ (Budke et al., 2014)). Andere Pflanzen besitzen ebenso AF(G)Ps mit Molaren Massen im Bereich von 1.32 bis 70 kDa, die hohe IRI-Aktivitäten bei Konzentrationen mit maximaler Aktivität zwischen 0.6 und $15.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Gupta, R. and Deswal, R., 2014a) aufweisen.

Tabelle 3.6: Werte von k_{d0} und c_i für die eisrekristallisationsinhibierenden Birkenpollenmakromoleküle in 45 Gew% Sucroslösung aus der Anpassung mit Gleichung (2.41). Für die Konzentration c_i kann nur ein minimaler Wert angegeben werden, da sie über ein grob abgeschätztes Verhältnis der Konzentration der eisbindenden zu eisnukleierenden Moleküle ermittelt wurde.

$k_{d0} [\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}]$	c_i [Verdünnungsfaktor]	$c_i [\text{nmol l}^{-1}]$	$c_i [\mu\text{g ml}^{-1}]$
1.001	0.731 ± 0.463	$> 7.575 \pm 4.919$	$> 0.758 \pm 0.492$

Der Versuch, die Thermische Hysterese der Antifrieremoleküle aus den Birkenpollen zu erfassen, war dagegen weder in Experimenten am Kryomikroskop noch am DSC erfolgreich (s. **Anhang A.4.4**). Es wird eine zu geringe Konzentration der Moleküle und eine damit verbundene sehr geringe Hystereseaktivität vermutet, die mit den vorliegenden Messgeräten mit einer Temperaturgenauigkeit von $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $0.05 \text{ }^\circ\text{C}$ nicht erfasst werden kann. Diese Annahme wird durch bisher in Pflanzen gemessene TH-Werte von beispielsweise $0.03 \text{ }^\circ\text{C}$ (Winterroggen) oder $0.19 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sanddorn) bei deutlich höheren Konzentrationen (0.1 bzw. 0.2 mg ml^{-1}) als von den Birkenpollenmolekülen mit etwa $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ verfügbar waren bekräftigt (Bredow, M. and Walker, V. K., 2017).

Aufgrund der hohen Rekristallisationsinhibierungsaktivität und geringen TH-Aktivität kann vermutet werden, dass die Hauptfunktion der Antifrieremoleküle aus den Birkenpollen in der Verlangsamung des Kristallwachstums und nicht in der von ihnen verursachten Gefrierpunktniedrigung liegt, was ein durchaus typisches Verhalten in gefriertoleranten Organismen ist.

Das grundsätzliche Potential von Birkenpollenmolekülen als Antifriersubstanzen konnte über Eisstrukturierungs- und Eisrekristallisationsexperimente an einer konzentrierten und aufgereinigten Probe des Birkenpollenwaschwassers aufgezeigt werden. Nun stellen sich drei weitere Fragen: Welche chemischen Funktionalitäten sind für die Antifriereigenschaften essentiell bzw. in die eisbindende Stelle eingebunden? Sind das eisnukleierende und das eisbindende Molekül dasselbe Molekül? Und zu welcher Substanzklasse gehören diese Moleküle? Der ersten Frage wird im folgenden **Abschnitt 3.1.2.3** nachgegangen, während den letzteren Fragen in **Kapitel 3.1.3** über IR- und Zentrifugenfilterexperimente auf den Grund gegangen wird.

3.1.2.3 Charakterisierung des Antigefriermoleküls

Desweiteren wurde der Einfluss von Borat, das Komplexe mit dem Zielmolekül über Hydroxylgruppen bilden kann, und des pH-Werts auf die Eisstrukturierungseigenschaften in einer begleitenden Arbeit von L. Wiehemeier (Wiehemeier, 2015) untersucht (**Abbildung 3.13**). Die schwach ausgeprägte Antigefrieraktivität der eisbindenden Moleküle einer moderat konzentrierten BPWW-Lösung #C (a); blau umrandet), die eine nur geringe und von einer Sucrose-Referenzmessung (schwarz) kaum unterscheidbare Eisstrukturierung bewirken, wird durch die Zugabe von Borat (grün) entfernt, wie an der runden Form eines gewachsenen Eiskristalls zu erkennen ist. Die geringe Löslichkeit von Borat bei tieferen Temperaturen führt bei höheren Boratkonzentrationen zu einem Auskristallisieren des Salzes, weshalb eine moderat konzentrierte IAP-Ausgangslösung eingesetzt wurde, um weniger Borat zur vollständigen Komplexierung zufügen zu müssen.

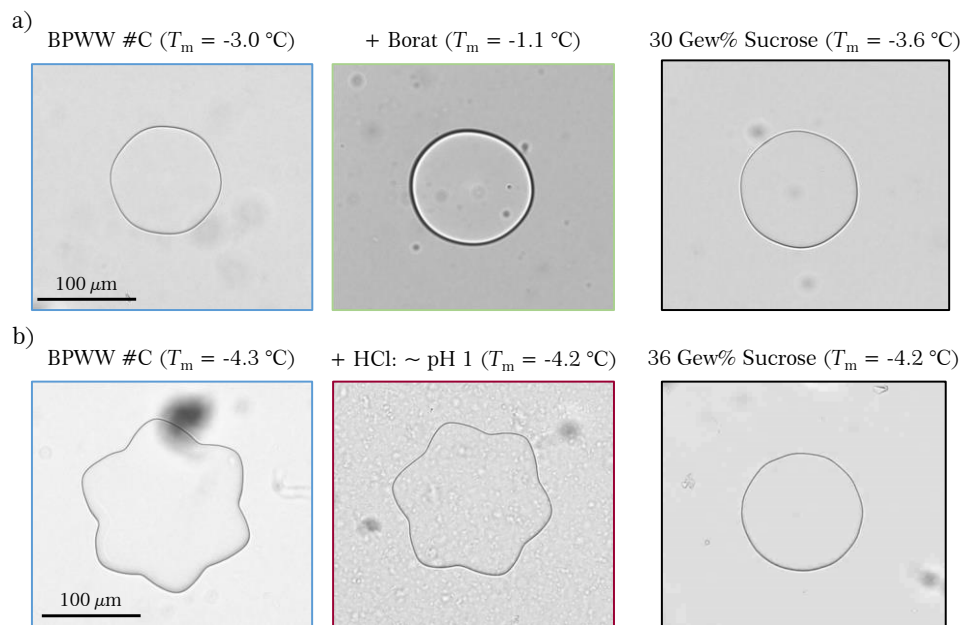


Abbildung 3.13: Eistrukturierungsexperimente bei einer Kühlrate von -0.01 °C min^{-1} an BPWW #C (blau umrandet) zeigen einen Einfluss von a) Borat auf die Aktivität der eisbindenden Moleküle, während b) eine Erniedrigung des pH-Wertes (dunkelrot) keine Änderung bewirkt. Bilder, ausgenommen die der Referenzmessungen, entnommen aus Experimenten von (Wiehemeier, 2015).

Dagegen hat die Änderung des pH-Wertes auf pH 1 (b); dunkelrot) keinen Einfluss auf die Eisstrukturierung. Eine um den Faktor 2 reduzierte Anzahl an eisstrukturierenden Molekülen, die aus der Abnahme der Eisnukleationsaktivität schätzungsweise angenommen wird (**Abbildung 3.6b**), würde bei der hohen Eisstrukturierungsaktivität der Ausgangslösung (blau) keine detektierbare Änderung erwirken.

Diese mit den Untersuchungen zu der Eisnukleationsaktivität vergleichbaren Ergebnisse deuten auf eine strukturelle Ähnlichkeit der eisnukleierenden und eisbindenden Moleküle hin. Auch die antigefrieraktiven Moleküle besitzen

Hydroxylgruppen, sodass durch die Komplexierung durch Borat die Fähigkeit zur Adsorption an Eis entfernt wird, indem die eisbindende Stelle entweder direkt abgedeckt oder die Struktur der in die Eisbindung involvierten eisähnlichen Hydrathülle gestört wird. Der pH-Wert hat auch auf diese Aktivität keinen detektierbaren Einfluss, sodass angenommen werden kann, dass anionische Säuregruppen nicht in die Eisbindung involviert sind oder deren Protonierung kaum Einfluss auf die Struktur der einbindenden Stelle hat.

3.1.3. Analytik an Birkenpollen-Makromolekülen

Über Infrarotspektroskopie sollen Informationen über die chemische Struktur der eisnukleierenden Birkenpollenmakromoleküle erhalten werden. Da das Waschwasser selbst ein Gemisch vieler verschiedener wasserlöslicher und von den Pollenkörnern gespülter Moleküle ist, erscheint eine Auswertung auf Grundlage des IR-Spektrums dieses Waschwassers weniger sinnvoll, sodass in erster Linie das Spektrum der aufgereinigten Probe IAP 2 zur Ermittlung der funktionellen Gruppen in den eisbindenden Molekülen herangezogen wird (**Abbildung 3.14; Tabelle A.5**). Dabei wird hier nur der Spektralbereich zwischen 1800 und 800 cm^{-1} gezeigt, da in diesem Bereich die charakteristischen Absorptionen stattfinden, während die bei höheren Wellenzahlen um $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ absorbierenden O-H- oder C-H-Valenzschwingungen nicht spezifisch für eine bestimmte Substanzklasse sind.

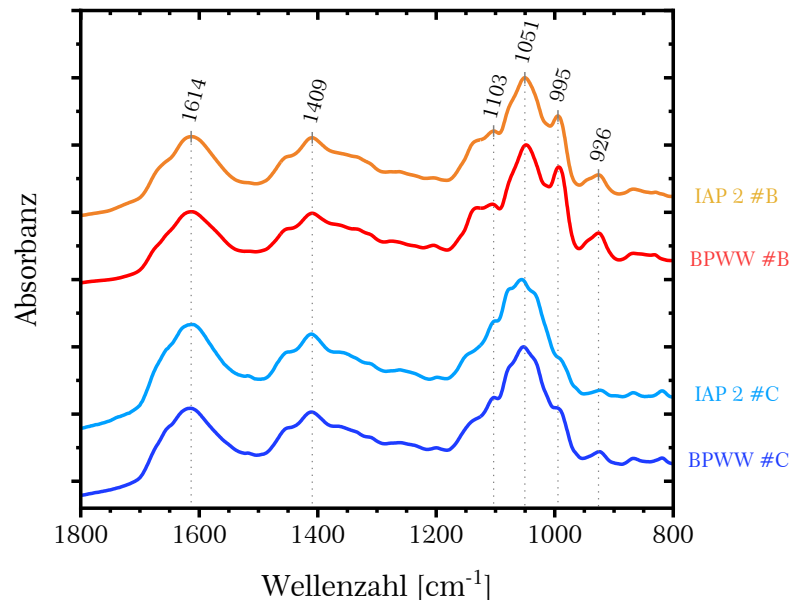


Abbildung 3.14: ATR-IR-Spektren der Birkenpollenwaschwasserproben von #B (rot) und #C (blau) sowie der jeweiligen zweifach aufgereinigten Proben (orange bzw. hellblau). Die eisbindenden Moleküle weisen ein dem jeweiligen Waschwasser sehr ähnliches Bandenmuster auf. Die Banden bei 1614 cm^{-1} und 1409 cm^{-1} sind auf eine Carboxylatgruppe zurückzuführen, der Bandenbauch zwischen 950 cm^{-1} und 1150 cm^{-1} auf die C-O-Schwingungen in Sacchariden. Die Spektren sind auf die Maxima normiert.

Tatsächlich sind die Spektren des Waschwassers und der aufgereinigten Probe sowohl für die Birkenpollen #B (rot bzw. orange) als auch für die Pollen #C (blau bzw. hellblau) sehr ähnlich, was darauf hindeutet, dass die eisbindenden Moleküle den Hauptbestandteil des Waschwassers stellen. Auch beim Vergleich der beiden verschiedenen Pollenlieferungen sind viele Ähnlichkeiten zu bemerken mit intensiven Banden bei 1614 und 1409 cm^{-1} sowie im Bereich zwischen 1150 und 950 cm^{-1} mit einem Maximum um 1050 cm^{-1} . Vergleichbare IR-Spektren von Birkenpollenwaschwasser finden sich in anderen Publikationen (Pummer et al., 2013b; Gute and Abbatt, 2018; Felgitsch et al., 2018). Des Weiteren fällt auf, dass das Spektrum der Pollen #B im Spektralbereich um 1050 cm^{-1} strukturierter ist als das Spektrum der #C Pollen, was möglicherweise im Zusammenhang mit dem Auftreten eines Eisnukleators (#B) bzw. von zwei Eiskeimarten (#C) steht. Anzumerken ist hier, dass das IR-Spektrum der Pollen #A, die ebenfalls zwei Eiskeime enthalten, vergleichbar mit dem Spektrum der Pollen #C ist (**Abbildung A.15**).

Zur genaueren Auswertung des Bandenmusters werden IR-Spektren mehrerer Referenzsubstanzen (chemische Strukturformeln s. **Tabelle A.10**) herangezogen, die in **Abbildung 3.15** dem Spektrum der IAP-Probe #B gegenübergestellt sind. Besonders auffällig ist die starke Absorption im für C-O-Valenzschwingungen charakteristischen Bereich zwischen 1200 und 900 cm^{-1} , in dem sämtliche als Referenzen vermessene Polysaccharide ihr Absorptionsmaximum haben (s. auch **Tabelle A.6**). Damit wird die aus den Ergebnissen der vorherigen Experimente bezüglich des Einflusses von Borat auf die Eisnukleation und Eisstrukturierung aufgestellte Vermutung einer Polysaccharid-Struktur bestätigt. Das am Beispiel des AFP III (rot) gezeigte Proteinbandenmuster mit der Amid-I- (1650 cm^{-1} ; C=O-Valenz) und der Amid-II-Bande bei 1540 cm^{-1} , die aus der C-N-Valenzschwingung kombiniert mit einer N-H-Deformationsschwingung resultiert (Barth, A. and Zscherp, C., 2002), ist im Pollenspektrum nicht zu detektieren, sodass ein Protein als bedeutend beitragende Substanz ausgeschlossen werden kann. Die beiden prägnanten Banden bei 1614 und 1409 cm^{-1} lassen sich der antisymmetrischen und symmetrischen Streckschwingung einer Carboxylatgruppe zuordnen, wie der Vergleich mit dem Alginatspektrum (violett) deutlich aufzeigt. Durch die Protonierung der Carboxylatgruppen bei Erniedrigung des pH-Wertes (dunkelrot) verschiebt sich die Bande bei 1614 cm^{-1} zu höheren Wellenzahlen (1732 cm^{-1}). Diese Bandenverschiebung ist analog bei der Protonierung der Referenzsubstanz Hyaluronat (blau) zu Hyaluronsäure (hellblau) zu beobachten, bei denen die zwei Banden bei 1650 und 1540 cm^{-1} auf die Amidbindungen des Glykosaminglucans zurückzuführen sind. Auch im protonierten IAP-Spektrum sind Banden bei 1650 und um 1540 cm^{-1} sichtbar. Während die Bande bei 1650 cm^{-1} auch durch Spuren von Wasser in der auf dem ATR-Kristall zwar getrockneten, aber aufgrund der Viskosität der ursprünglichen Lösung möglicherweise glasartig gewordenen Probe hervorgerufen werden kann, könnte die Bande bei 1540 cm^{-1} nicht nur auf Spuren eines Glykosaminglucans, sondern auch eines Proteins hinweisen. Desweiteren würde eine Sulfatgruppe wie im Heparin

(dunkelgelb) eine intensive Bande bei 1200 cm^{-1} ergeben, weshalb eine Beteiligung von oxidierten Schwefelgruppen ausgeschlossen werden kann.

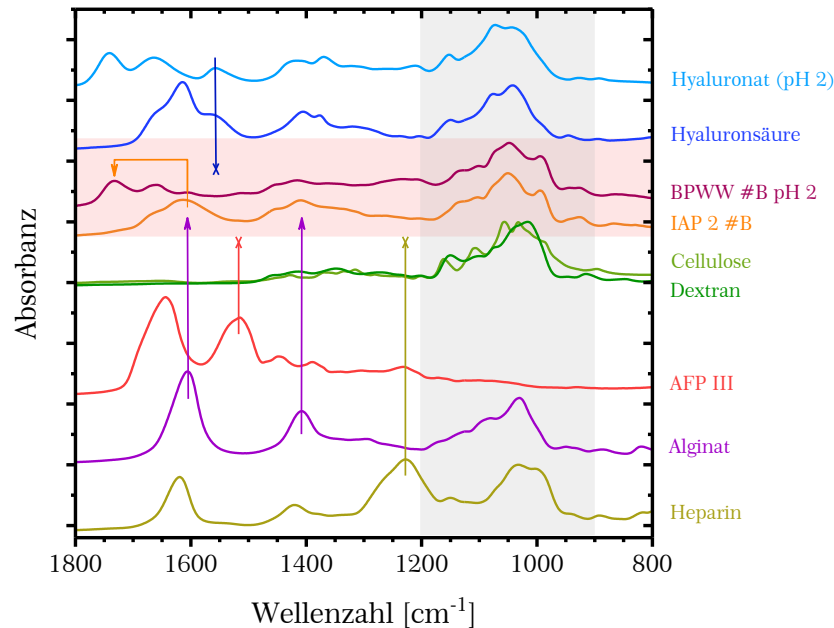


Abbildung 3.15: ATR-IR-Spektren sämtlicher Referenzsubstanzen im Vergleich mit der IAP 2 #B-Probe (orange). Die Pfeile zeigen gleiche Banden in dem Proben- und jeweiligen Referenzspektrum auf, die mit einem Kreuz endenden Pfeile weisen auf in der IAP-Probe nicht vorhandene Banden hin. Die Spektren sind jeweils auf ihr Maximum um 1050 cm^{-1} skaliert, mit Ausnahme des Proteinspektrums, das auf die Amid-II-Bande bei 1540 cm^{-1} normiert ist.

Zusammengefasst kann anhand der IR-Spektren vermutet werden, dass die eisbindenden Moleküle der Birkenpollenproben #B und #C, und damit auch #A, carboxylierte, anionische Polysaccharide sind. Möglicherweise sind einige Carboxylatgruppen über eine Amidbindung an die Zuckerkette geknüpft. Dabei beeinflusst die Protonierung dieser Carboxylatgruppen weder die Eisnukleations- noch die Eisstrukturierungsaktivität, wie in entsprechenden Experimenten ([Kapitel 3.1.1](#) und [3.1.2.3](#)) aufgezeigt werden konnte.

3.1.3.1 Größenausschlussexperimente

Die Experimente mit den eisnukleierenden und eisadsorbierenden Molekülen bezüglich deren Reaktion mit dem Hydroxylgruppen komplexierenden Borat sowie zur Untersuchung des pH-Wert-Einflusses gaben einen Hinweis auf eine vergleichbare chemische Struktur dieser Moleküle, die nach Analyse der IR-Spektren vermutlich der Klasse der Polysaccharide angehören. Um zu überprüfen, ob dasselbe Molekül diese beiden Eigenschaften aufweist oder es sich um unterschiedliche Moleküle handelt, wurde die aufgereinigte IAP 2-Lösung der Birkenpollen #B über einen 100 kDa -Zentrifugenfilter aufgetrennt. Anschließend wurden die beiden erhaltenen und auf das ursprüngliche Volumen gebrachten Fraktionen sowohl auf die Eisnukleations- als auch die Eisstrukturierungsaktivitäten untersucht ([Abbildung 3.16](#)). Dabei zeigt sich in den DSC-Thermogrammen (a)), dass der Eisnukleator in dem

Filter zurückbleibt (hellorange, Mitte), d.h. größer als 100 kDa sein muss, während das Filtrat (gelb, unten) keine eisnukleierenden Moleküle enthält. Dieses Ergebnis bestätigt somit die Beobachtungen von Pummer et al. (2012) und O'Sullivan et al. (2015). Die Zentrifugenfilter können unterschiedlich große Moleküle voneinander trennen, jedoch keine verlässliche Aussage über deren tatsächliche Größe geben. Andererseits zeigt die mehrmals ($\sim 10 \times 5-10$ min @ 5 000 UpM) mit Wasser gewaschene konzentrierte Überstandslösung mit 30 Gew% Sucrose keine Eisstrukturierung (b); Mitte). Dagegen erhält ein in der Filtratlösung mit demselben Medium wachsender Eiskristall (unten) eine eindeutige Sternchenform. Aus diesen Beobachtungen kann gefolgert werden, dass die Moleküle, die für die Eisnukleation verantwortlich sind, nicht identisch sind mit den eisbindenden Molekülen, welche Eiskristalle strukturieren und deren Eisrekristallisation inhibieren.

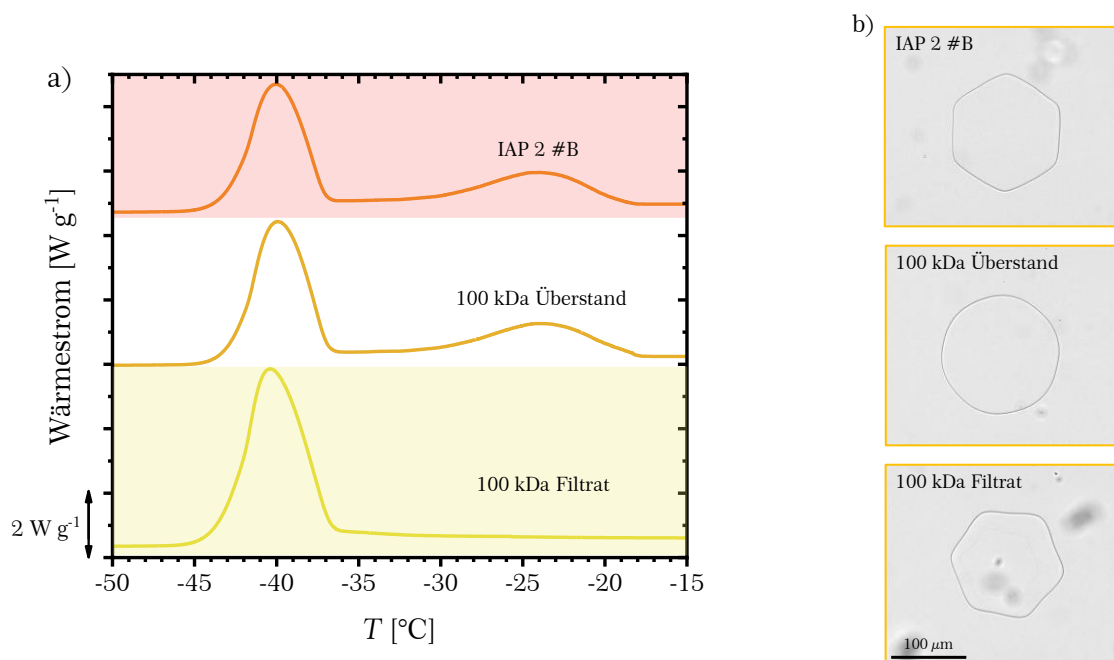


Abbildung 3.16: Zentrifugenfilterexperiment an IAP 2 #B und anschließende Analytik bezüglich der a) Eisnukleationsaktivität und b) Eisstrukturierungsaktivität. Der Eisnukleator mit einer Größe von mindestens 100 kDa ist nicht identisch mit dem eisstrukturierenden Molekül, da dieses kleiner als 100 kDa sein muss.

Da die Eisnukleatoren durch die für eisbindende Moleküle spezifische Aufreinigung ebenfalls extrahiert werden konnten, kann eine potentielle Antiegefrieraktivität vermutet werden. Möglicherweise ist deren Konzentration zu gering, um einen Effekt detektieren zu können. Gleichermäßen können auch die eisadsorbierenden Moleküle eisnukleationsaktiv sein, aufgrund ihrer geringen Größe jedoch bei sehr niedrigen Temperaturen nukleieren (s. [Kapitel 3.4](#)), sodass eine Erfassung der heterogenen Nukleation mittels DSC nicht möglich ist. Bei einer Größe kleiner als ~ 5 kDa würde die theoretisch vorhergesagte Nukleationstemperatur unterhalb der homogenen Nukleationstemperatur von ~ -37 °C in den DSC-Messungen liegen. Daher kann angenommen werden, dass die Größe des eisbindenden Moleküls über die Funktion als Eisnukleator oder Antiegefrieremolekül entscheidet.

Ein analoges Experiment wurde mit dem nicht aufgereinigten Waschwasser #C durchgeführt, das die gleichen Ergebnisse bei den DSC-Eisnukleationsexperimenten ergab (Dreischmeier et al., 2017). Die Eisstrukturierungsmessungen lassen dagegen keine eindeutigen Schlüsse zu, da aufgrund der nicht erfolgten Aufreinigung sehr konzentrierte Medien mit Schmelztemperaturen von -7.9 °C (BPWW) bzw. sogar -13.3 °C (Filtrat) vorlagen, sodass die in lediglich einer von fünf Filtratmessungen beobachtete Eisstrukturierung eher als dendritisches Wachstum zu interpretieren ist. Aus der Überstandsprobe waren durch das mehrmalige Waschen mit Wasser die meisten niedermolekularen gelösten Substanzen entfernt, weshalb der Schmelzpunkt der mit 30 Gew% Sucrose versetzten Überstandslösung von -4.4 °C in dem üblichen Temperaturbereich liegt. Diese Probe zeigte keinerlei Eisstrukturierung. Allerdings ist diese Aussage mit Vorsicht zu behandeln, da die in der Waschwasserprobe vor der Größenauftrennung beobachtete Strukturierung aufgrund deren hoher Lösungsviskosität ebenfalls auf dendritisches Wachstum zurückgeführt werden könnte und die Probe möglicherweise gar keine Eisstrukturierungsaktivität besaß.

Eine Analyse der IR-Spektren der aufgereinigten IAP-Proben war aufgrund der zu geringen Probenmenge bzw. -konzentration nicht möglich, da es wegen der geringen Absorbanz zu einer Überlagerung der Filtratspektren mit dem Spektrum von Glycerin kam, das aus den Zentrifugenfiltern mit heraus gewaschen wurde. Die in der Publikation von Dreischmeier et al. (2017) gezeigten Filtrat-IR-Spektren weisen aus demselben Grund ein dem Glycerin ähnliches Bandenmuster im Zuckerbereich auf. Diese Messungen wurden aufgrund der erst im Anschluss an die Veröffentlichung erlangten Erkenntnis dieses von Glycerin bedingten Artefaktes an einer neu präparierten Waschwasserprobe wiederholt und sind in dieser Arbeit in **Abbildung 3.17** gezeigt. Da aufgezeigt werden konnte, dass die eisbindenden Moleküle den Hauptbestandteil des Waschwassers stellen, können die Spektren der Waschwasserproben zur Analyse dieser Moleküle herangezogen werden. Die Probenmessungen wurden hierbei erst nach mehrmaligem Spülen des Filters mit Wasser durchgeführt, bis in Testmessungen eine vernachlässigbare Glycerin-Absorption detektiert wurde.

Bei Betrachtung der IR-Spektren der aufgetrennten Birkenpollenwaschwasserproben #B und #C zeigt sich sowohl für die eisnukleierenden (Überstand, Mitte) als auch eisstrukturierenden Moleküle (Filtrat; unten, gelb unterlegt) ein mit dem Waschwasser (oben, rot unterlegt) vergleichbares Bandenmuster. Den Molekülen gemein sind die prägnanten Banden im für Zuckermoleküle bzw. Polysaccharide typischen Absorptionsbereich der C-O-Valenzen zwischen 1150 und 950 cm^{-1} sowie die für Carboxylatgruppen charakteristischen Absorptionsbanden bei 1600 und 1410 cm^{-1} , was für eine chemisch sehr ähnliche Struktur spricht. Das #B-Filtratspektrum (rot) setzt sich überwiegend aus den kleineren, eisstrukturierenden Molekülen zusammen. Aufgrund der sehr großen Ähnlichkeit des Bandenmusters und der

relativen Intensitäten mit denen des Waschwasserspektrums (rot) kann darauf geschlossen werden, dass diese Moleküle im Waschwasser im Überschuss vorliegen und daher den Hauptbeitrag zu dem Waschwasserspektrum geben. Eine etwas von diesem Bandenmuster abweichende Form des Überstandsspektrums (rot) deutet auf einen lediglich marginalen Unterschied in den Strukturen der eisnukleierenden und eisstrukturierenden Moleküle hin. Möglicherweise resultiert dieser kleine Unterschied aus einer Aggregation der kleineren eisadsorbierenden Moleküle zu den größeren eisnukleierenden.

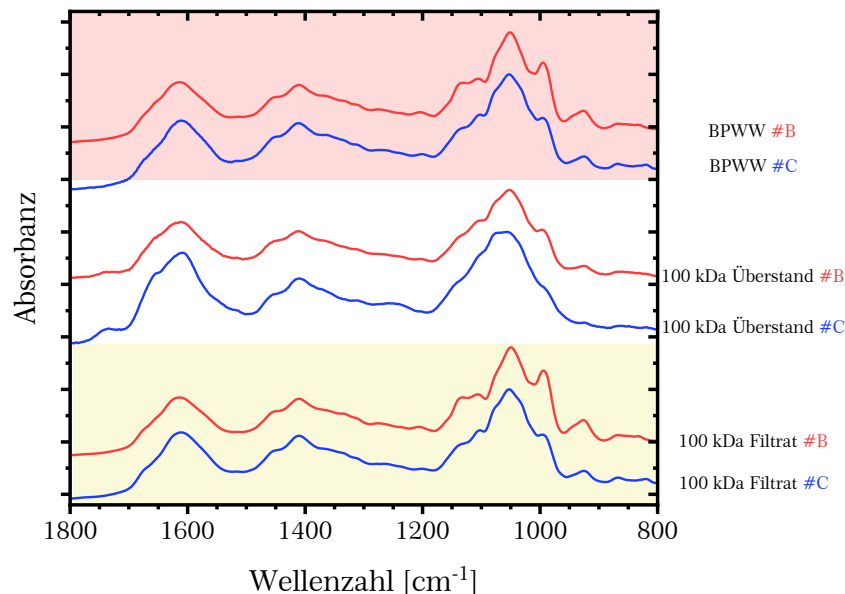


Abbildung 3.17: ATR-IR-Spektren der über einen 100 kDa-Zentrifugenfilter aufgetrennten Birkenpollenwaschwasser #B (rot) und #C (blau). Die auf die jeweiligen Maxima skalierten Spektren zeigen die chemische Ähnlichkeit der Moleküle auf.

Auch bei Betrachtung der Spektren der Birkenpollen #C (blau) fällt auf, dass das Filtratspektrum dem des Waschwassers identisch ist, was analog zu den #B-Pollenspektren gedeutet werden kann, während das Überstandsspektrum ein abweichendes Muster im C-O-Absorptionsbereich besitzt. Dieses kann mit dem Vorhandensein eines zweiten Eisnukleators in den Birkenpollen #C erklärt werden: Das Überstandsspektrum von #C bildet sich aus dem auch in den #B-Pollen enthaltenen aktiveren Eiskeim ($T_{\text{het}} = -18 \text{ °C}$) und dem zweiten Eisnukleator ($T_{\text{het}} \sim -23 \text{ °C}$). Da sich das Waschwasser-Spektrum aus dem Überstands- und Filtratspektrum zusammensetzt, kann mittels einer Linearkombination der Spektren das Konzentrationsverhältnis der eisnukleierenden (Überstand) und eisstrukturierenden (Filtrat) Moleküle zueinander abgeleitet werden. Demnach trägt das Überstandsspektrum lediglich zu einem maximalen Anteil von $\sim 11 \%$ zu dem Waschwasserspektrum bei. Da die Eisnukleatoren eine weitaus höhere Molare Masse haben, wird ein molares Verhältnis von weniger als ~ 0.1 zwischen den eisnukleierenden und eisadsorbierenden Molekülen geschätzt.

Weitere Analytik der Birkenpollen-Eisnukleatoren ist im [Anhang A.9](#) dargelegt: In einem Gelierungsexperiment zeigt sich der polysaccharidische Charakter der eisbindenden Moleküle. Gelektrophorese-Experimente bestätigen das Vorhandensein

von im Überschuss vorliegenden kleinen Molekülen. Desweiteren wurde der Einfluss von Erhitzen auf die Nukleationsaktivität in DSC-Experimenten untersucht.

3.1.4. Pollen als Eisnukleatoren und Antifriersubstanzen

Frühere Studien konnten durch Eisnukleationsmessungen die generelle Eisnukleationsaktivität von Pollen bei Temperaturen oberhalb von -20 °C nachweisen (Diehl et al., 2002; von Blohn et al., 2005; Pummer et al., 2012). Mit Blick auf die am Beispiel der Birkenpollen aufgezeigten Antifriereigenschaften von aus den Pollen waschbaren Makromolekülen stellt sich die Frage, ob auch diese Eigenschaft auf sämtliche Pollenarten zutrifft.

Dazu wurden die Erlenpollen (*Alnus glutinosa*) und Kieferpollen (*Pinus sylvestris*) als weitere Beispielsubstanzen ausgewählt. Die DSC-Messungen an den Pollenwaschwassern (**Abbildung 3.18**) bestätigen die guten Eisnukleationsaktivitäten der beiden Pollenspezies mit Onsettemperaturen der heterogenen Nukleationssignale bei -18 °C (Erle; hellblau) und -20 °C (Kiefer; magenta).

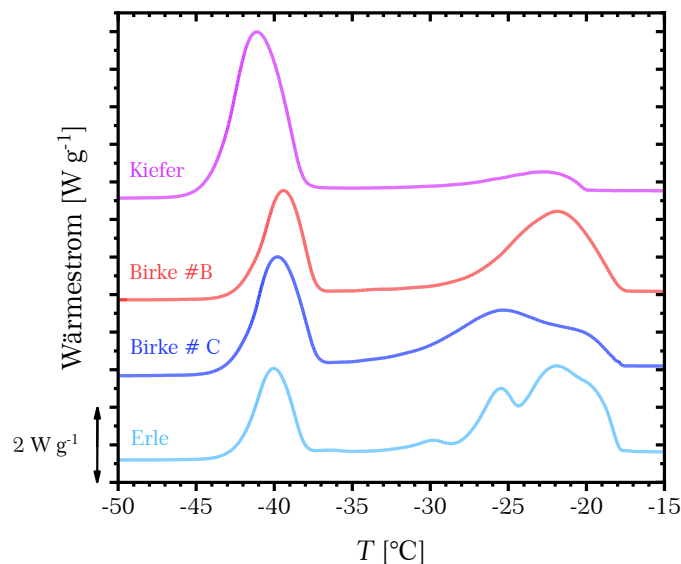


Abbildung 3.18: DSC-Messungen zeigen eine heterogene Nukleationsaktivität nicht nur in dem Washwasser der Birkenpollen (#B: rot; #C: blau), sondern auch von Erlenpollen (hellblau) und Kieferpollen (magenta) um -20 °C für eine Kühlrate von -5 °C min^{-1} .

Zu beachten ist hierbei die geringe Gefrierpunktserniedrigung in den jeweiligen Lösungen, erkennbar an der leichten Verschiebung des homogenen Nukleationssignals um $0,5$ bis 1 °C zu niedrigeren Temperaturen und dem hier nicht gezeigten Schmelzpunkt von $-0,44\text{ °C}$ (Erle) bzw. $-0,63\text{ °C}$ (Kiefer). Die Erlenpollen besitzen wie die Birkenpollen #C (blau) mehrere Eisnukleatoren, während die Kieferpollen analog zu Birke #B (rot) nur einen Keim aufweisen.

Da die beiden ausgewählten Pollen eine mit den Birkenpollen vergleichbare Eisnukleationsaktivität um -20 °C besitzen, wird eine ebenso ähnliche Antifrieraktivität vermutet, die sich in den Eisstrukturierungsexperimenten

(**Abbildung 3.19**) auch bestätigt. Analog zu den Birkenpollen wachsen die in dem jeweiligen Pollenwaschwasser gewachsenen Eiskristalle in eine sternchen- oder blümchenähnliche Form, die aus der Adsorption der Moleküle an die sekundäre prismatische Fläche resultiert. Hierbei sind die durch gelöste Substanzen hervorgerufenen niedrigen Schmelzpunkte von -5.6 °C (Erle; a)) und sogar -10.2 °C (Kiefer; b)) bei der Analyse zu beachten. Aufgrund der damit verbundenen erhöhten Viskosität könnte es sich möglicherweise auch um dendritisches Wachstum handeln. Die sechseckige Form der noch sehr kleinen Kristalle zu Beginn der Kühlphase ist jedoch ein eindeutiges Merkmal für adsorbierte Moleküle. Referenzmessungen von Lösungen mit ähnlichen Schmelzpunkten von -5.6 °C (42 Gew% Sucrose) sowie von -8.2 °C in einer PDA-Lösung (Potato Dextrose Agar; s. **Kapitel 3.2**) weisen keine vergleichbaren Strukturierungen auf.

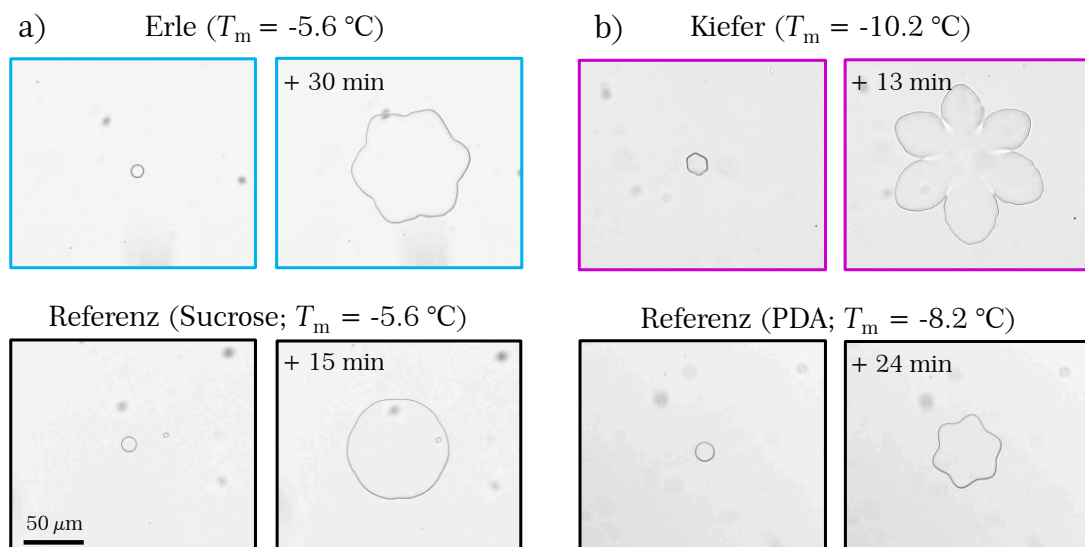


Abbildung 3.19: Eisstrukturierung (Kühlrate -0.01 °C min^{-1}) in konzentriertem a) Erlenpollen- und b) Kieferpollenwaschwasser, die deutlich stärker ausgeprägt ist als in den Referenzlösungen mit denselben Schmelztemperaturen.

Auch die IR-Spektren (**Abbildung 3.20**) der Erlen- und Kieferpollen (hellblau bzw. magenta) zeigen eine große Ähnlichkeit zwischen den in dieser Arbeit untersuchten Pollenarten, da alle ein sehr ähnliches Bandenmuster aufweisen, das jeweils auf ein carboxyliertes Polysaccharid hindeutet. Außerdem fällt eine Korrelation zwischen der Anzahl an Eiskeimen und der Struktur des Bandenbauchs im für Zucker charakteristischen Bereich zwischen 1150 und 950 cm^{-1} auf. Die beiden Pollen Erle und Birke #C mit zwei oder mehr Eisnukleatoren besitzen ein unstrukturierteres und nahezu identisches Bandenmuster in diesem Spektralbereich als die Pollen Kiefer und Birke #B mit nur einem Eiskeim, deren Banden deutlich definierter sind und ebenfalls gleiche Intensitäten haben.

Diese Ergebnisse zeigen sowohl eine strukturelle Ähnlichkeit der Makromoleküle verschiedener Pollenarten, die als carboxylierte Polysaccharide identifiziert wurden, als auch deren identische Eigenschaften als Eisnukleatoren und Moleküle mit Antifrierpotential.

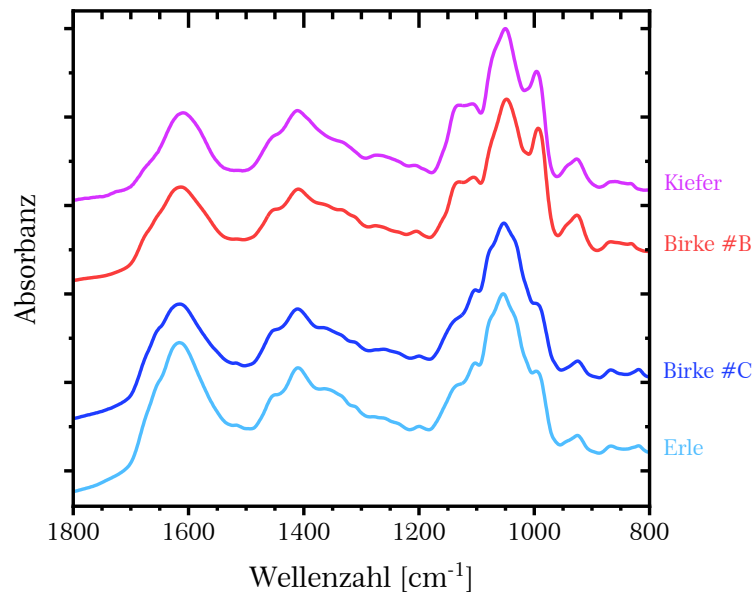


Abbildung 3.20: Das ATR-IR-Spektrum des Erlenpollenwaschwassers (hellblau) ist vergleichbar mit dem des BPWW #C (blau), das des Kieferpollenwaschwassers (magenta) dagegen mit dem des BPWW #B (rot). Die Spektren sind auf das jeweilige Maximum skaliert.

3.1.5. Zusammenfassung Birkenpollen

Aufbauend auf früheren Studien zu der Eisnukleationsaktivität von Pollen und Experimenten zur Analyse der an der Nukleation beteiligten funktionellen Gruppen wurden am Beispiel von Birkenpollen ergänzenden Messungen bezüglich der Eisnukleationseigenschaften durchgeführt. Die Nukleationsmessungen am BINARY ergaben eine hohe Anzahl von maximal 10^4 aktiven Eiskeimen pro Pollenkorn bei -23 °C . Damit wurden nicht nur die Ergebnisse von Augustin et al. (2013) und O'Sullivan et al. (2015), sondern auch der von Pummer et al. (2012) beobachteten wasserlösliche Charakter der molekularen Eisnukleatoren bestätigt. Über DSC-Messungen konnte eine Abhängigkeit der Anzahl an Eiskeimen von saisonalen Differenzen gezeigt werden. Die in verschiedenen Jahren gesammelten Birkenpollen wiesen eine unterschiedliche Menge der bei -18 °C bzw. -22 °C das Gefrieren auslösenden Eiskeime auf. Eine vergleichbare Beobachtung wurde schon von Augustin et al. (2013) an den an unterschiedlichen geographischen Orten eingesammelten Birkenpollen gemacht. Eine Auftrennung der Probe über 300 kDa- und 100 kDa-Filter zeigte an, dass die Molare Masse dem dazwischen liegenden Massenbereich zugeordnet werden kann, was auch von Pummer et al. (2012) gefunden wurde. Dabei ist jedoch zu beachten, dass diese Filter keine genaue Molmasseneinteilung ermöglichen.

Mittels DSC-Experimenten, in denen ein Emulsionströpfchen nur einen einzigen oder wenige Eiskeime enthält, ließen sich sehr gut die Einflüsse verschiedener chemischer Verbindungen auf die Eisnukleationsaktivität untersuchen. Dabei zeigte

sich eine Verringerung der Anzahl heterogen nukleierender Tropfen aufgrund der Zerstörung von Eiskeimen durch die Anwesenheit der Salze Guanidiniumchlorid (GdmCl) und Natriumchlorid (NaCl). Dieses Verhalten deutet auf eine definierte Tertiärstruktur hin, die essentiell für die Eisnukleationsaktivität ist.

Desweiteren wurde auch der Frage nachgegangen, ob die wasserlöslichen eisnukleierenden Makromoleküle zusätzlich Antigefriereigenschaften besitzen. Um störende Effekte des Mediums des Birkenpollenwaschwassers auszuschließen und die eisbindenden Moleküle spezifisch zu extrahieren, wurde die in dieser Arbeit eingerichtete Eisaffinitätsaufreinigung angewandt. Anhand der durch diese Methode aufgereinigten Probe konnte tatsächlich sowohl eine Eisstrukturierungsaktivität, die sich aufgrund der Adsorption an die sekundäre prismatische Fläche in einer Sternchen- oder Blümchenform äußerte, als auch eine Eisrekristallisationsaktivität mit einer abgeschätzten effektiven Konzentration $c_i > 7 \text{ nmol l}^{-1}$ bzw. $> 0.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ nachgewiesen werden, die damit mit der sehr effektiven AFGPs vergleichbar ist. An einer Größenauftrennung anschließende Eisstrukturierungsexperimente offenbarten, dass im Gegensatz zu den mindestens 100 kDa großen Eisnukleatoren die eisadsorbierenden Moleküle kleiner als 100 kDa sein müssen.

Damit konnte für die Makromoleküle aus den Birkenpollen zwar keine duale Funktion nachgewiesen werden, jedoch zeigen die IR-Spektren der beiden Moleküle sehr ähnliche Bandenmuster auf, weshalb eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der eisadsorbierenden und eisnukleierenden Moleküle vermutet werden kann. Möglicherweise bestehen die größeren der eisbindenden Moleküle, die als Eisnukleatoren fungieren, aus Clustern der kleineren eisadsorbierenden Moleküle, deren potentielle Eisnukleationsaktivität aufgrund der anzunehmenden sehr geringen Molekülgröße und der damit zusammenhängenden niedrigen Nucleationstemperatur nicht detektierbar war.

Die IR-Spektren lassen auf carboxylierte Polysaccharide schließen, was durch die Entfernung der Eisnukleations- und Eisstrukturierungsaktivität in Anwesenheit von Borat, das mit Hydroxylgruppen Komplexe bildet, eine Bestätigung erfährt. Damit gehören die Pollen zu den wenigen biologischen Organismen, in denen nicht-proteinöse Eisnukleatoren und Antigefrierer-moleküle gefunden wurden. Bekannt waren bisher Xylomannan-basierte Glykolipide als nicht-proteinöse Eisnukleatoren, die u.a. in dem Käfer *Upis ceramoides* für dessen Gefriertoleranz verantwortlich sind (Walters, JR. et al., 2011; Walters, JR. et al., 2009).

Ergänzende Messungen an anderen Pollenarten deuten darauf hin, dass die Bildung von Eisnukleatoren und Antigefrierer-molekülen ein Charakteristikum sämtlicher Pollen ist. Die in mindestens zehnfach höherer Konzentration vorliegenden kleineren Antigefrierer-moleküle hemmen durch Adsorption an in der Pollenflüssigkeit vorhandenen oder entstehenden Eiskristallen die Ostwald-Reifung und vermindern dadurch einen möglichen Gefrierschaden durch wachsende Eiskristalle. Da die

Thermische Hysterese kleiner als $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ anzunehmen ist, während eine hohe Eisrekristallisationsinhibierungs- und eine Eisnukleations-Aktivität vorliegen, können die Pollen zu den gefriertoleranten Organismen gezählt werden. Eine Funktion der Eisnukleatoren könnte auch eine durch Nukleation in der Atmosphäre ausgelöste Niederschlagsbildung und dadurch gewährleistete Verteilung der Pollen sein. Durch die hohe Anzahl wasserlöslicher eisnukleierender Moleküle ist deren Beitrag zur atmosphärischen Eisnukleation mit Auswirkungen auf klimatische Prozesse nicht zu vernachlässigen.

3.2. Mortierella alpina

Die am Beispiel der Birkenpollen (**Kapitel 3.1**) durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung einer möglichen Antigefriereigenschaft von enthaltenen Makromolekülen und zur Analyse struktureller Merkmale wurden ebenso an dem Pilzextrakt aus *Mortierella alpina* angewandt. Zwei Pilzproben von *M. alpina* ID13A wurden in den Jahren 2016 und 2017, was im Folgenden dementsprechend gekennzeichnet ist, in der Arbeitsgruppe von J. Fröhlich-Nowoisky (Max-Planck-Institut für Chemie, Mainz) auf PDA-Nährböden (PDA: **Potato Dextrose Agar**) angesetzt und geerntet. Jeweils zwei Platten wurden mit 10 ml Wasser gewaschen und der wässrige Extrakt zunächst über $5\ \mu\text{m}$ und anschließend über $0.1\ \mu\text{m}$ filtriert (Kunert, 2017). Die Pilzextrakte wurden gefriergetrocknet erhalten (2016: 55 mg; 2017: 66 mg) und für die folgenden Experimente in frisch bidestilliertem Wasser aufgenommen. Gelagert wurden die Proben im Gefrierschrank, um eine Alterung zu vermindern.

Da es sich bei der Probe um einen Pilzextrakt handelt, der zwar filtriert, aber nicht weiter aufgereinigt wurde, wurde die Eisaffinitätsaufreinigung (IAP) angewendet, mit der spezifisch eisbindende Moleküle herausgefiltert werden können. Es soll in dieser Arbeit einerseits die Frage beantwortet werden, ob der Eiskeim, der in früheren Publikationen schon charakterisiert wurde (Pummer et al., 2015; Fröhlich-Nowoisky et al., 2015), oder ein anderes Molekül aus *M. alpina* eisstrukturierende Eigenschaften aufweist und andererseits eine strukturelle Analyse durchgeführt werden. Die Aufreinigung erfolgte sowohl in dem großen Gefäß ($\sim 180\ \text{ml}$; 2016) als auch in kleinem Volumenmaßstab ($\sim 18\ \text{ml}$; 2017), wobei durch die erhöhte Konzentration in dem zehnmal geringeren Volumen eine effektivere Extraktion der eisbindenden Moleküle erhofft wurde. Die in **Abbildung 3.21** gezeigte aufgereinigte und geschmolzene Lösung zeigt durch ihre Transparenz ein Entfernen nicht eisbindender Moleküle wie die Farbstoffmoleküle an, während die verbliebene restliche Lösung wie die Stammlösung eine gelbliche Färbung aufweist.

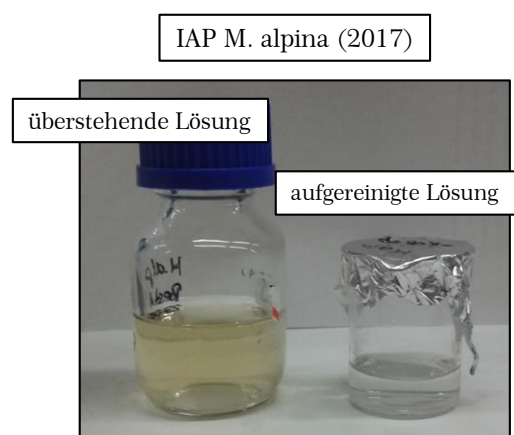


Abbildung 3.21: Die über IAP aufgereinigte *M. alpina*- Lösung (Becherglas rechts) zeigt keine Färbung mehr wie die Stamm- bzw. restliche Lösung der IAP (Glasflasche links), was auf eine Verdrängung nicht eisbindender Moleküle wie die Farbstoffmoleküle aus dem wachsenden Eis zeigt.

Die Emulsions-Nukleationsmessungen am Wärmestromkalorimeter (DSC) (**Abbildung 3.22**) zeigen eine Extraktion der bei etwa -6 °C eisnukleierenden Moleküle (Kühlrate -5 °C min^{-1}) aus der Lösung heraus in die Eisfraktion (blau), wenn auch die Signalintensität auf eine geringere Konzentration als in der Stammlösung (violett) und in der verbleibenden Lösung (grün) hindeutet. Damit wird der (moderate) eisbindende Charakter des Eisnukleators aufgezeigt.

Die erhaltene Nukleationstemperatur bestätigt die Ergebnisse von Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) mit $T_{50} = -7\text{ °C}$. Das Thermogramm einer 0.1 Gew\% -igen wässrigen Lösung des Nährbodens PDA (orange; PDA 2016), die der maximal löslichen Menge des Gels bei Erwärmen auf $+60\text{ °C}$ entspricht, mit fehlendem heterogenen Nukleationssignal schließt einen Beitrag des möglicherweise zu einem geringen Anteil in die Probe gelangten Nährbodens zu der Eisnukleationsaktivität bei -6 °C aus (Sabadasch, 2017). Die Schmelztemperaturen (Daten nicht gezeigt) für eine Heizrate von $+1\text{ °C min}^{-1}$ zeigen, dass in den verdünnten *M. alpina*-Proben innerhalb der Messungengenauigkeit von 0.3 °C keine Gefrierpunkterniedrigung vorliegt.

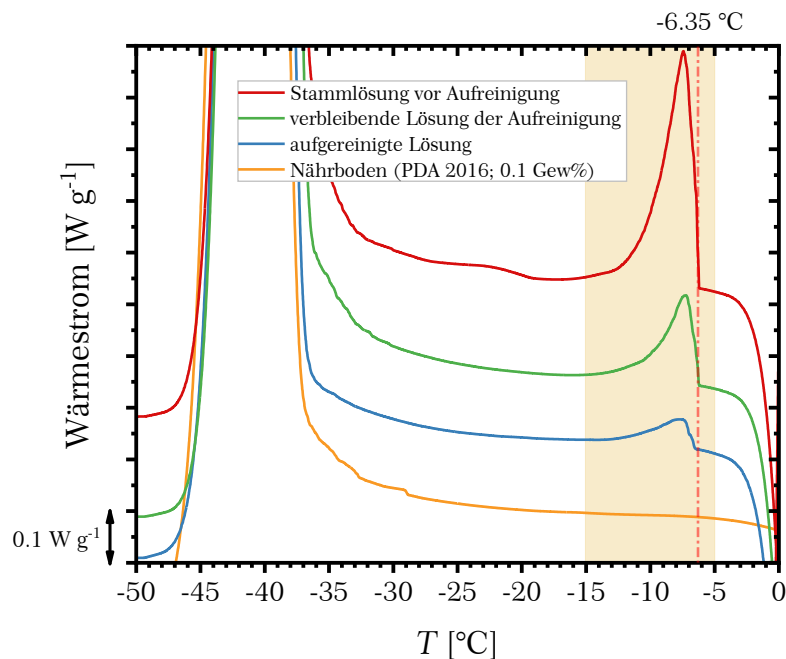


Abbildung 3.22: DSC-Thermogramme (-5 °C min^{-1}) der *M. alpina*-Lösungen vor (rot) und nach (grün) der Aufreinigung. Die aufgereinigte Probe (blau) enthält ebenfalls den heterogenen Eiskeim, der die Nukleation bei $\sim -6\text{ °C}$ auslöst. Der Eisnukleator muss aus dem Pilz stammen, da der Nährboden PDA (orange) bei seiner maximal möglichen Konzentration keine heterogene Nukleation aufweist.

Da aus der Stammlösung etwa 60% des Volumens ausgefroren wurden und die Volumina der Restlösung und der aufgereinigten Probe auf das anfängliche Volumen aufgefüllt wurden, geben die Signalintensitäten eine gute Übersicht über die Konzentrationen relativ zueinander.

Mit dieser aufgereinigten Lösung, die im Folgenden vereinfacht mit IAP abgekürzt wird, wurden desweiteren Nukleationsmessungen zur Charakterisierung des molekularen Eiskeims bezüglich der Größe und der strukturellen Funktionalitäten

durchgeführt, was im folgenden **Abschnitt 3.2.1** dargelegt ist. Desweiteren wurde die aufgereinigte **M. alpina**-Probe auf die eisstrukturierenden und eisrekristallisations-inhibierenden Eigenschaften untersucht (**Kapitel 3.2.2**). In **Kapitel 3.2.3** diskutierte IR-Spektren sollen über die funktionellen Gruppen der eisbindenden Moleküle Aufschluss geben und die Strukturaufklärung vorantreiben.

3.2.1. Charakterisierung des heterogenen Eisnukleators aus **M. alpina**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl mittels dynamischer Wärmestromkalorimetrie als auch am BINARY Eisnukleationsexperimente an verschiedenen **M. alpina**-Proben durchgeführt, um einerseits die Größe des Eisnukleators einteilen zu können und andererseits Informationen bezüglich der strukturellen Eigenschaften zu erhalten. Das in der Literatur (Pummer et al., 2015; Fröhlich-Nowoisky et al., 2015) erwähnte Ergebnis der Zentrifugenfilter-Experimente, die auf eine Eiskeimgröße zwischen 100 und 300 kDa hindeuten, wurde in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt (s. **Abbildung 3.23**). Allerdings muss hier beachtet werden, dass die Zentrifugenfilter keine genaue Molmasseneinteilung erlauben. Deutlich unterschiedliche Größen der Moleküle werden durch die Auftrennung aber angezeigt. Die Eiskeime passieren einen 300 kDa-Filter, bleiben aber in dem 100 kDa-Filter hängen. Sowohl das heterogene Signal im DSC-Thermogramm für die entsprechende Probe der Restlösung der IAP 2017 (a), dunkelblaue Kurve) als auch die $n_m(T)$ -Kurve mit Nukleationsereignissen zwischen -6 und -8 °C für die IAP-Probe 2016 (b), dunkelblaue Dreiecke) zeigen dies. Dagegen ist in dem Filtrat nur noch eine verschwindend geringe Anzahl an den Eisnukleatoren (a), lila Kurve) enthalten, die im BINARY (b)) mit einer deutlich geringeren Anzahl an Tropfen gar nicht mehr erfasst werden. Hier wird allerdings ein weiterer, bei Temperaturen unterhalb von -20 °C aktiver Eiskeim detektiert (lila Dreiecke), der mutmaßlich aus dem Nährboden (grau) übertragen worden ist.

Die Konzentration in der IAP-Probe wurde aus der Messkurve von **M. alpina** mit bekannter Ausgangskonzentration (rot; Sabadasch (2017)), die eine hohe Eiskeimanzahl von $\sim 10^{11}$ pro Gramm Pilzextrakt liefert, über den Verdünnungsfaktor bei Erreichen des Plateaus zurückgerechnet. Die Konzentration der PDA-Lösung (PDA 2018), die durch Abwaschen einer Nährbodenplatte analog zu der Ernteprozedur der Pilzsporen erhalten wurde, wurde auf die gleiche Weise über einen Vergleich mit der $n_m(T)$ -Kurve einer 0.1 Gew%-igen PDA-Lösung unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren abgeschätzt.

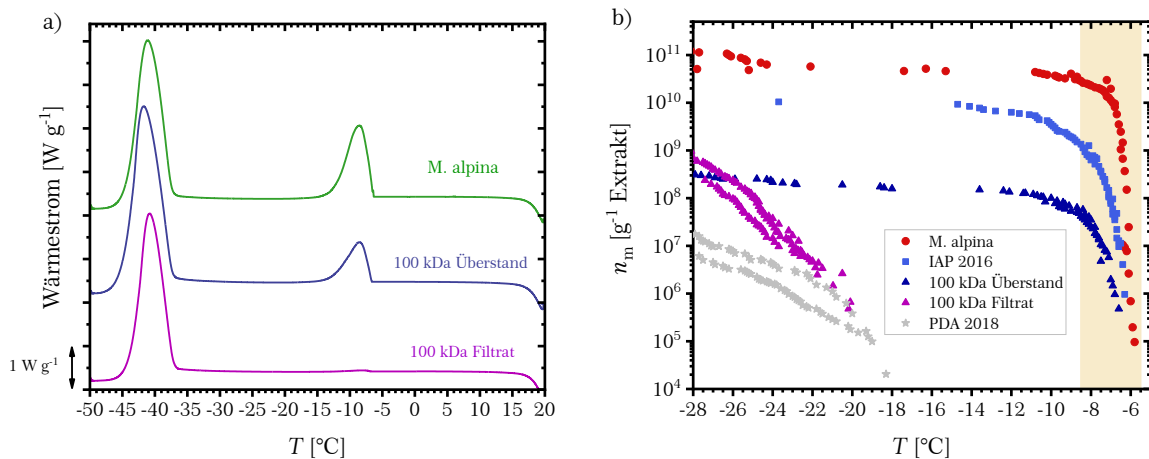


Abbildung 3.23: Experimente mit einem 100 kDa-Zentrifugenfilter stellen deutlich die Größe des eisnukleierenden Moleküls in *M. alpina* heraus. Sowohl die a) DSC-Messungen mit einer Kühlrate von $-5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ als auch die b) BINARY-Messungen ($-1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) zeigen eine stark verminderte Eisnukleationsaktivität im Filtrat (lila) bei $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$, während die Nukleationsaktivität in dem Filterüberstand (dunkelblau) nur minimal reduziert ist, sodass der Eisnukleator größer als 100 kDa sein muss. Die BINARY-Daten weisen auf einen bei Temperaturen unterhalb von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nukleierenden Eiskeim in dem Nährboden PDA (grau) hin, der in die *M. alpina*-Probe übertragen worden sein muss, da er in dem Filtrat sichtbar wird.

3.2.1.1. Einfluss von gelösten Substanzen auf die Aktivität des Eisnukleators

Zur Überprüfung des Einflusses von Borat, das mit *cis*-ständigen Hydroxylgruppen Komplexe eingeht und somit Hinweise auf die Anwesenheit von Zuckergruppen im Molekül geben kann, auf die Eisnukleationsaktivität wurde eine *M. alpina*-Lösung mit Borat bis zur Sättigung ($\sim 50\text{ g l}^{-1}$; $\sim 0.1\text{ M}$) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Da das heterogene Nukleationssignal im DSC-Thermogramm bei $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Abbildung 3.24a**; hellgrüne Kurve) verschwindend gering ist, ist davon auszugehen, dass das Borat die aktive Stelle des Eiskeims durch Komplexierung der Hydroxylgruppen des Moleküls entfernt. Entweder sind die Hydroxylgruppen an der Nukleation beteiligt oder der Eiskeim fällt durch Komplexbildung mit Borat und dem Emulgator (Span65®) aus der wässrigen Lösung aus. Bei der Präparation der Emulsion fiel die Bildung eines farblosen Feststoffs auf, der auf eine Wechselwirkung des Emulgators mit dem Borat zurückgeführt werden kann. Der geringe Massenanteil des Borats von $\sim 5\text{ Gew}\%$ reduziert die Wassermenge in der Emulsion nicht so stark, dass der Verlust der Eisnukleationsaktivität dadurch verursacht sein könnte.

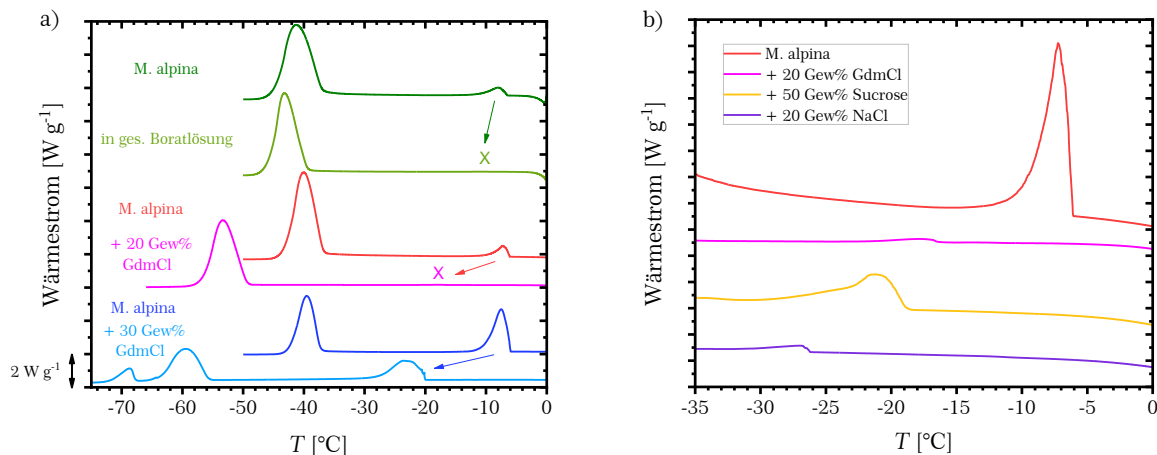


Abbildung 3.24: DSC-Thermogramme von *M. alpina*-Lösungen mit a) Borat (hellgrün) und Guanidiniumchlorid (magenta und hellblau) sowie b) Sucrose (gelb) und NaCl (violett) versetzt. Die Onsettemperaturen der Signale verschieben sich durch die Gefrierpunktserniedrigung zu tieferen Temperaturen. Ein Fehlen des heterogenen Signals, dargestellt durch ein X, weist auf Wechselwirkung der Substanz mit dem Eiskeim hin. Eine widersprüchliche Beobachtung wird mit den Messungen mit 20 Gew%-iger und 30 Gew%-iger GdmCl-Lösung gemacht. Die Reduktion des heterogenen Eisnukleationssignals in der 20 Gew%-igen Lösung könnte mit einer Denaturierung des Eisnukleators in Verbindung gebracht werden und resultiert nicht aus einer verminderten Wassermenge, da in einer 50 Gew%-igen Sucroselösung das Signal sogar eine höhere Intensität aufweist. Interessanterweise ist auch das Signal in der NaCl-Lösung verkleinert, was auf eine generelle Denaturierung des molekularen Eisnukleators durch ionische Substanzen zurückgeführt werden kann.

Diese Beobachtung deckt sich nicht mit der in Pummer et al. (2015) und Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) erwähnten Unempfindlichkeit gegenüber Borsäure in einem Tropfenexperiment. Es ist hierbei anzumerken, dass auch in dieser Arbeit in BINARY-Messungen die Eisnukleationsaktivität von *M. alpina* bei Anwesenheit von Borat erst bei einem Verdünnungsfaktor von 10^7 - 10^9 verschwand. Die Daten sind nicht gezeigt, da die Anfangskonzentration nicht bekannt war und daher keine quantitative Auswertung möglich ist. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Probenpräparation als bulk-Lösung oder Emulsion sein: In der Emulsion wird der Eiskeim durch die Komplexbildung mit dem Emulgator Span65® aus der Lösung entfernt, während in der bulk-Probe zwar die Hydroxylgruppen des Eisnukleators durch das Borat verdeckt werden, die Eisnukleation aber an einer anderen, unabhängigen Stelle des Moleküls ausgelöst wird. Demnach könnte es sich bei dem Eisnukleator etwa um ein Glykoprotein handeln, was auch die von Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) beobachtete Stabilität von *M. alpina* der Klade A gegenüber den Proteasen Papain und Pepsin erklären könnte, da die Zuckerhülle des Proteins als Schutzschild fungieren könnte.

Eine andere denkbare Deutung wäre, dass nur ein Teil der Eiskeime inaktiviert wurde, obwohl Borat selbst bei einer überschätzten Konzentration des Eiskeims von ~ 1 nM im deutlichen Überschuss vorliegt. Am BINARY kann die Nukleation bei einer Verringerung der Aktivität um den Faktor 2 oder 5 weiterhin erfasst werden, während

das DSC aufgrund des erwarteten sehr kleinen Signals (vgl. Stammlösung; (a), dunkelgrün) an das Detektionslimit stoßen würde.

Die Vermutung, dass es sich bei dem eisnukleierenden Molekül um ein Protein handelt, wurde von Pummer et al. (2015) und Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) daraus abgeleitet, dass die maximale kumulative Eiskeimanzahl $n_m(T)$ nicht nur durch Erhitzen bei +98 °C, sondern auch durch Versetzen mit 6 M des Chaotrops Guanidiniumchlorid von ursprünglich $\sim 10^9 \text{ g}^{-1}$ bei -6 °C auf 10^4 bzw. 10^6 bei -13 °C reduziert wird. Analog zu den Experimenten mit Birkenpollenwaschwasser von Pummer et al. (2012) stellt sich auch hier die Frage, warum in deren Gefrierexperimenten in der 6 M GdmCl-Lösung überhaupt Nukleation beobachtet wurde: Selbst in einer 20 oder 30 Gew%-igen Lösung kann die heterogene Nukleation aufgrund der Gefrierpunktserniedrigung erst bei -16 °C bzw. -20 °C beobachtet werden (**Tabelle 3.7**). Da deren Nukleationsmessgerät aufgrund des großen Tropfenvolumens von 50 μl auf Temperaturen oberhalb von -15 °C beschränkt ist, ist die Untersuchung eines möglichen Einflusses von GdmCl auf die heterogene Nukleation auch sehr aktiver Eisnukleatoren wie *M. alpina* weder in der gewählten Konzentration von 6 M noch bei moderaten Konzentrationen durchführbar. Das Argument der Interpretation des Eiskeimes aus *M. alpina* als ein Protein ist damit hinfällig.

Die in dieser Arbeit eingesetzte DSC-Methode ermöglichte die Erfassung der Nukleationstemperaturen bei tieferen Temperaturen. Da eine 6 M Lösung beim Abkühlen ein eutektisches Gemisch statt der Eisphase bildet (Stank, 2018), wurden geringere GdmCl-Konzentrationen von 2.6 M (20 Gew%) und 3.9 M (30 Gew%) eingesetzt (**Abbildung 3.24a**). Die Ergebnisse der beiden Experimente sind dabei allerdings gegensätzlich: Während in einer 20 Gew%-igen Lösung (magenta) das heterogene Signal nahezu vollständig verschwindet, bleibt es in der höher konzentrierten 30 Gew%-igen Lösung (hellblau; Stank, 2018(Stank, 2018)) erhalten und verschiebt sich lediglich aufgrund der Gefrierpunktserniedrigung zu niedrigeren Temperaturen (-20 °C). Das widersprüchliche Ergebnis lässt keine Interpretation bezüglich der chemischen Natur des Eiskeims zu. Da auch die Polysaccharide aus Birkenpollen (**Kapitel 3.1.1**) und die Komplexverbindung Trihydroxybenzol durch GdmCl inaktiviert werden (Stank, 2018), ist eine Proteinspezifität des denaturierenden Effektes von GdmCl ohnehin zu verwerfen.

In der *M. alpina*-Lösung mit 20 Gew% GdmCl-Lösung (magenta) fällt die Abnahme der Signalintensität stärker aus als in Referenzmessungen mit 50 Gew% Sucrose (gelb) und 20 Gew% NaCl (violett) (**Abbildung 3.24b**). Während die NaCl-Zugabe dennoch eine Verkleinerung des Signals bewirkt, ist das heterogene Nukleationssignal der Sucroslösung trotz des geringsten Wasseranteils am wenigsten verringert. Aufgrund der vergleichbaren Gefrierpunktserniedrigungen in der 20 Gew%-igen GdmCl- und 50 Gew%-igen Sucrose-Lösung kann ein Einfluss der temperaturabhängigen Kristallisationsenthalpie ausgeschlossen werden (**Tabelle 3.7**). Grundsätzlich kann also

jeder ionischen Substanz und nicht nur dem klassischerweise für Proteindenaturierung eingesetzten Guanidiniumchlorid die Fähigkeit, molekulare Eisnukleatoren zu denaturieren, zugeschrieben werden.

Tabelle 3.7: Die über das Onsetverfahren bestimmten heterogenen (T_{het}) und homogenen (T_{hom}) Nukleationstemperaturen für mit verschiedenen Substanzen versetzte *M. alpina*-Lösungen. Für die reine *M. alpina*-Lösung stellen die Werte Mittelwerte und ihre Standardabweichungen dar. Die Schmelztemperaturen wurden aus den Wendepunkten (*M. alpina*: Onset) der Schmelzkurven ermittelt. Im Fall der Boratlösung sind sowohl Wende- als auch Onsettemperatur gelistet, da der tatsächliche Schmelzpunkt innerhalb dieser beiden Grenzwerte liegt. Bei der Berechnung der Molalitäten wurde eine mögliche Dissoziation mit einbezogen. Kühlrate: -5 °C min^{-1} ; Heizrate: $+1\text{ °C min}^{-1}$. n.g. = nicht gemessen.

M. alpina + ...	T_m [°C]	T_{het} [°C]	T_{hom} [°C]
---	-0.06 ± 0.06	-6.35 ± 0.23	-37.06 ± 0.27
ges. Boratlösung (~0.1 M)	-2.56/-0.77	~ -8	-39.64
20 Gew% GdmCl (5.23 mol kg ⁻¹)	-6.79	-16.43	-49.41
30 Gew% GdmCl (8.97 mol kg ⁻¹)	-10.82	-20.10	-55.72
20 Gew% NaCl (8.56 mol kg ⁻¹)	n.g.	-26.22	n.g.
50 Gew% Sucrose (2.92 mol kg ⁻¹)	-7.80	-18.89	-55.95

3.2.2. Antifrieraktivität von *M. alpina*

Die an der *M. alpina*-Probe durchgeführte Eisaffinitätsaufreinigung weist auf den eisbindenden Charakter des bei -6 °C nukleierenden Eisnukleators hin. Eisstrukturierungs- und Eisrekristallisationsinhibierungsexperimente sollen die Antifrieraktivität der aufgereinigten Probe überprüfen und in Kombination mit spektroskopischen Methoden die Identität des eisbindenden Moleküls aufzeigen.

3.2.2.1. Eisstrukturierung an *M. alpina*-Proben

Ein in dem *M. alpina*-Extrakt ($\sim 55\text{ mg ml}^{-1}$) gewachsener Eiskristall zeigt eine sternähnliche Form, die aus der Adsorption von Molekülen an die sekundäre prismatische Fläche von Eis resultiert (**Abbildung 3.25**: links, rot umrandet). Im Gegensatz zu der IAP der ersten *M. alpina*-Probe (2016), die in einem etwa 200 ml fassenden Vorratsgefäß durchgeführt wurde, wurde 2017 ein kleinerer, mit etwa 20 ml füllbarer Behälter zur Aufreinigung benutzt, damit die Konzentration an eisbindenden Molekülen erhöht ist und mehr dieser Moleküle in die Eisfraktion eingebaut werden können. Tatsächlich ergab die 2017 aufgereinigte und anschließend aufkonzentrierte ($\sim 7.5\ \mu\text{l}$) Probe (Mitte, blau) eine Strukturierung des Eiskristalls ausgelöst durch die extrahierten eisbindenden Moleküle.

Aufgrund des Ausschlusses eines Großteils der in der Pilzprobe gelösten Substanzen, die den Gefrierpunkt der Stammlösung auf -4.5 °C herabsetzen, wurde 25 Gew% Sucrose zu der IAP-Lösung gegeben, um die Messung bei den üblichen Bedingungen durchführen zu können. Die etwas geringere Menge an Sucrose als standardmäßig

vorgesehen liegt in den restlichen gelösten gefrierpunktserniedrigenden Substanzen in der aufgereinigten Probe begründet. Wegen des geringen *M. alpina*-Probenvolumens wurde die Aufreinigung nur einmal durchgeführt.

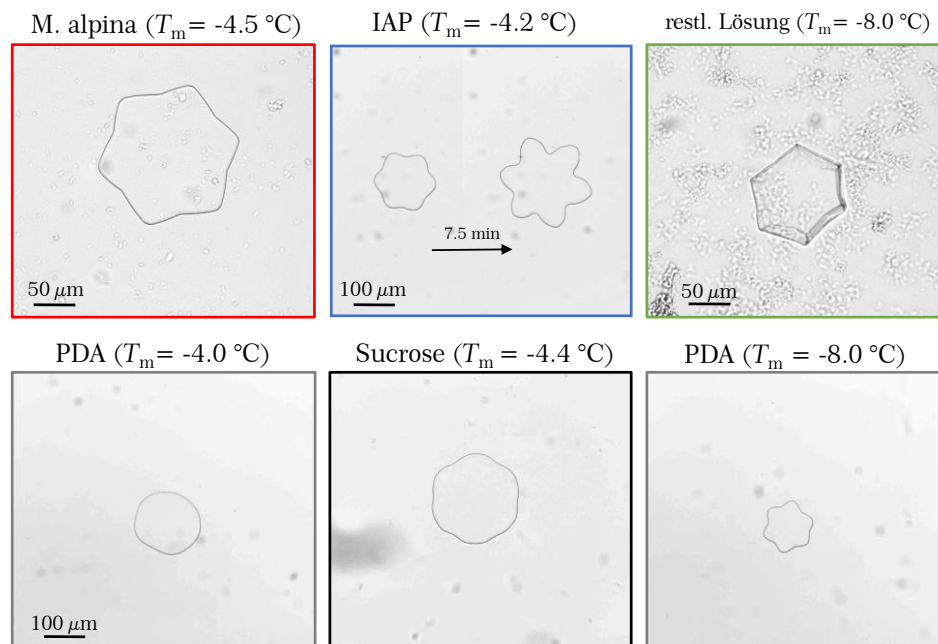


Abbildung 3.25: Eisstrukturierung ($-0.01 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$) durch adsorbierende Moleküle in der *M. alpina*-Stammlösung (55 mg ml^{-1} ; rot umrandet), einer konzentrierten Lösung von IAP 2017 mit 25 Gew% Sucrose (blau) und ein Beispiel für die deutliche Strukturierung in der überstehenden Lösung der Aufreinigung 2016 (grün). Zum Vergleich sind Referenzmessungen in PDA 2018-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und in einer 36 Gew%-igen Sucroselösung gezeigt, die eine geringer ausgeprägte Strukturierung durch dendritisches Wachstum in den viskosen Lösungen zeigen.

Die restliche Lösung der Aufreinigungsprozedur (rechts, grün) enthält eisstrukturierende Moleküle in deutlich höherer Konzentration als in der aufgereinigten Probe, wie die sehr stark ausgeprägte Eisstrukturierung zeigt, die sogar das dreidimensionale Wachstum des Eises erkennen lässt. Der Eiskristall erhält eine leicht angedeutete bipyramidale Form. Aufgrund der etwas niedrigeren Schmelztemperaturen um $-4 \text{ } ^\circ\text{C}$ und $-8 \text{ } ^\circ\text{C}$ in den untersuchten Proben werden jeweils Referenzmessungen mit dem Medium Sucrose und dem Nährboden PDA 2018, von dem möglicherweise kleine Mengen bei dem Abwaschen der Pilzsporen in die Probe gelangt waren, in Lösungen mit ähnlichem Schmelzpunkt zum direkten Vergleich angeführt. Trotz der (leichten) Strukturierung von Eiskristallen in den Lösungen mit höherer Konzentration an gelösten Substanzen, die eine Folge von dendritischem Wachstum wegen der erhöhten Viskosität der Lösung ist, kann die Eisstrukturierung in den *M. alpina*-Proben eindeutig auf ein an Eis adsorbierendes Molekül zurückgeführt werden.

3.2.2.2. Eisrekristallisationsinhibierung an *M. alpina* IAP

Um der Überlegung zur Funktion des eisadsorbierenden Moleküls als Eisrekristallisationsinhibitor nachzugehen, wurden Rekristallisationsexperimente (IRI) mit der aufgereinigten Probe IAP durchgeführt. Da nur sehr wenig Probenvolumen, um eine genügend hohe Konzentration zu gewährleisten, zur Verfügung stand, wurden lediglich fünf Messungen bei der Stammkonzentration der IAP-Probe und keine Verdünnungsreihe durchgeführt. Daher konnte auch keine effektive Konzentration c_i ermittelt werden. Die IAP-Probe wurde als 35 Gew%-ige Sucroslösung statt wie üblich als 45 Gew%-ige Lösung angesetzt, um auch hier wie bei den Eisstrukturierungsexperimenten den gefrierpunktserniedrigenden Effekt gelöster Substanzen zu berücksichtigen. Allerdings wurde dieser Effekt unterschätzt, sodass die 35 Gew%-ige Sucrose-IAP-Lösung einen niedrigeren Schmelzpunkt als eine reine 45 Gew%-ige Sucrose-Lösung hat und die IRI-Messungen daher nicht wie üblich bei -8 °C , sondern bei -10 °C durchgeführt werden mussten. In **Abbildung 3.26a** sind die aufgenommenen Bilder aus den IRI-Messungen sowohl für die *M. alpina*-IAP-Probe (rechts, blau) als auch für eine 47.5 Gew%-ige Sucroslösung (Mitte, schwarz) sowie eine ~ 1 Gew%-ige PDA 2018-Lösung (links, grau) als Referenzen zu Beginn (1 min, obere Reihe) und nach 120 Minuten Halten bei -10 °C (untere Reihe) gezeigt. Die Konzentrationen der Referenzlösungen wurden so gewählt, dass deren Eisanteil dem der IAP-Lösung von ~ 0.1 entspricht.

Eine Verlangsamung der Rekristallisation der Eiskristalle in der *M. alpina*-Probe, die in einer größeren Anzahl kleinerer Eiskristalle resultieren würde, ist auf den Bildern nicht zu erkennen. Die Adsorption von Molekülen lässt sich anhand der Strukturierung der größeren Kristalle erahnen. Ein direkter Vergleich der Kristallgrößen in den Bildern ist zudem dadurch erschwert, dass durch die hohe heterogene Nukleationsaktivität in der *M. alpina*-Probe das Gefrieren des Probenfilms trotz Anwendens einer sehr hohen Kühlrate von -100 °C min^{-1} bei höheren Temperaturen ausgelöst wurde, was in der Bildung eines polykristallinen Eisfilms mit einem größeren mittleren Radius resultierte.

Die IRI-Aktivität lässt sich daher nur durch die Bestimmung der Ratenkonstanten k nach der LSW-Theorie (2.38) ermitteln. In **Abbildung 3.26b** sind die sich zeitlich ändernden kubischen mittleren Kristallradien r^3 gegen die Zeit t aufgetragen, aus deren linearen Verläufen über die Steigung eine Aussage über die Geschwindigkeit der Rekristallisation getroffen werden kann. Während r^3 in der Sucroslösung (schwarz) und näherungsweise in der PDA-Lösung (grau) aufgrund einer vollständigen Diffusionslimitierung gleichmäßig ansteigt, knickt die *M. alpina*-Kurve (blau) nach etwa 35 min ab, was auf einen langsameren Anstieg der Radien ab diesem Zeitpunkt hindeutet. In Kombination mit der Eisstrukturierung kann dieser verringerte Anstieg der Kristallradien mit einer Verlangsamung der Eisrekristallisation durch adsorbierende Moleküle erklärt werden.

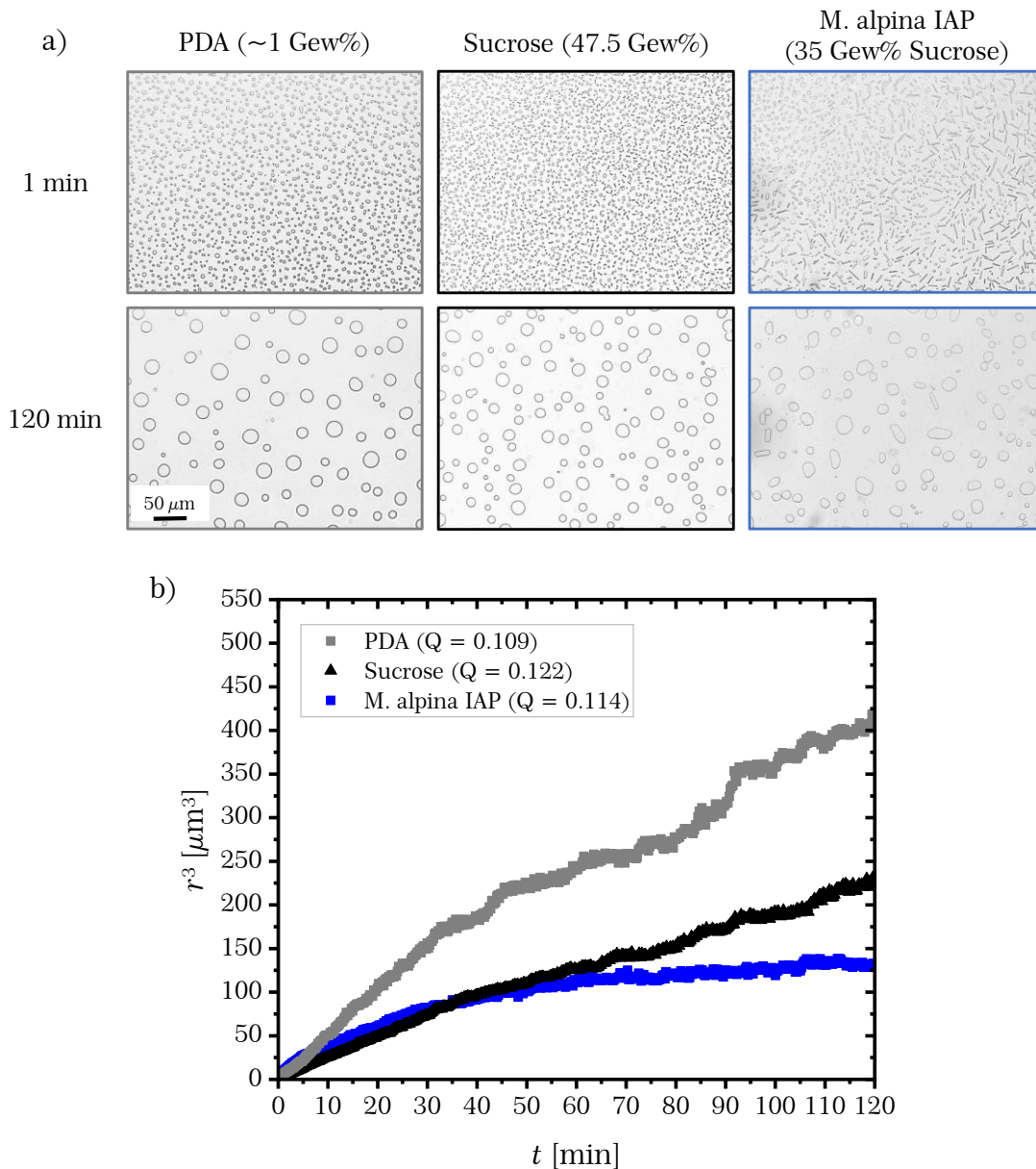


Abbildung 3.26: Messungen zur Erfassung der Eisrekristallisationseigenschaften von *M. alpina*- und Referenzlösungen bei ähnlichen Eisanteilen. a) Bilder der Eisrekristallisation bei -10 °C in der aufgereinigten und aufkonzentrierten *M. alpina*-Lösung (IAP 2017 + 35 Gew% Sucrose; blau) und den Referenzen PDA 2018 ($\sim 1\text{ mg ml}^{-1}$; grau) und Sucrose (47.5 Gew%; schwarz), die weniger auf Inhibierung, aber auf Adsorption von Molekülen hindeuten. b) Für die Referenzen Sucrose (schwarz) und PDA (grau) wird ein linearer Anstieg des kubischen Kristallradius mit der Zeit aufgrund der vollständigen Diffusionslimitierung beobachtet. In der *M. alpina*-Probe (blau) findet ab Minute 35 ein langsames Eiskristallwachstum statt als Resultat der Hemmung des Einbaus neuer Wassermoleküle durch adsorbierte Moleküle.

Dieses Verhalten ist auch in den wenigen weiteren Messungen bei verschiedenen Eisanteilen Q erkennbar (**Abbildung 3.27**). Die zweiten Steigungen k_2 der $r^3(t)$ -Kurven der IAP-Messungen (blaue Kreise), die der wachstumsinhibierten Ratenkonstante k_1 entsprechen, sind grundsätzlich kleiner als k_1 bzw. k_d der Referenzen Sucrose (schwarze Dreiecke) und PDA (graue Vierecke). Eine *M. alpina*-Messung ($Q = 0.13$) zeigt dagegen einen einfachen linearen Verlauf nach **Gleichung (2.40)** mit einer großen

Ratenkonstante $k_1 = 4.5 \mu\text{m min}^{-1}$. In den konzentrationsabhängigen Kurven in **Abbildung 3.12** und **Abbildung 3.33** ist erkennbar, dass im Bereich moderater Konzentrationen beim Übergang zwischen vollständiger Diffusionskontrolle und vollständiger Wachstumsinhibierung durchaus große Schwankungen in der Ratenkonstante k möglich sind.

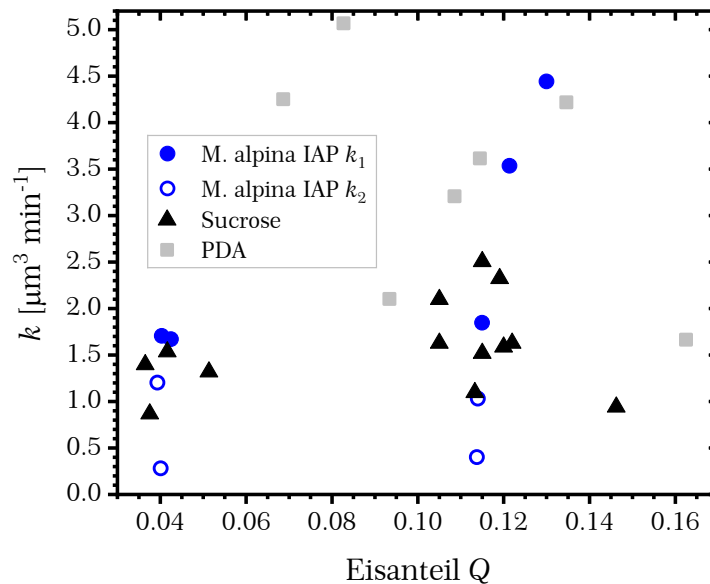


Abbildung 3.27: Ratenkonstanten k in Abhängigkeit vom Eisanteil Q für die Messungen der IAP-Probe von *M. alpina* mit 35 Gew% Sucrose (blau) sowie der Referenzen Sucrose (schwarz) und PDA 2018 (grau). Die zweiten Steigungen k_2 (offene blaue Kreise), die den wachstumsinhibierten Prozess in den *M. alpina*-Proben beschreiben, sind generell am kleinsten.

3.2.2.3. Charakterisierung des eisadsorbierenden Moleküls

Die nächste Frage, die sich an dieser Stelle nun stellt, ist die nach der Identität des eisadsorbierenden Moleküls. Ist der Eisnukleator, der in der aufgereinigten Probe enthalten ist, tatsächlich auch das Molekül, das in dem Pilz über Eisrekristallisationsinhibierung zu der Gefriertoleranz beiträgt?

Dazu wurde die über einen 100 kDa-Zentrifugenfilter aufgetrennte *M. alpina*-Probe auf Eisstrukturierung untersucht (**Abbildung 3.28**). Tatsächlich zeigt der gewaschene Filterüberstand (Mitte, dunkelblau) der konzentrierten Restlösung aus IAP 2016 (links, grün) mit Molekülen größer als 100 kDa, der nachweislich den Eisnukleator enthält (s. **Abbildung 3.23**), keine Strukturierung des Eiskristalls. Dagegen weist ein in der Filtratlösung (rechts, lila) gewachsener Eiskristall die Form einer hexagonalen, stark abgestumpften Bipyramide auf.

Die Zugabe von 33 Gew% Sucrose zu der Überstandslösung ergab einen Schmelzpunkt von $-6 \text{ }^\circ\text{C}$, was auf eine trotz mehrmaligen Waschens (25x) des Überstandes bedeutende Menge an gelösten Substanzen hindeutet. Dennoch ist keine Eisstrukturierungsaktivität mehr in der Lösung vorhanden, sodass auf ein kleines eisadsorbierendes Molekül, das den 100 kDa-Filter passieren kann, geschlossen

werden kann. Die etwas unrunde Kristallform in der Überstandsprobe kann auf dendritisches Wachstum durch die erhöhte Konzentration an gelösten Substanzen zurückgeführt werden, wie die entsprechenden Referenzmessungen mit Sucrose und PDA 2018 zeigen.

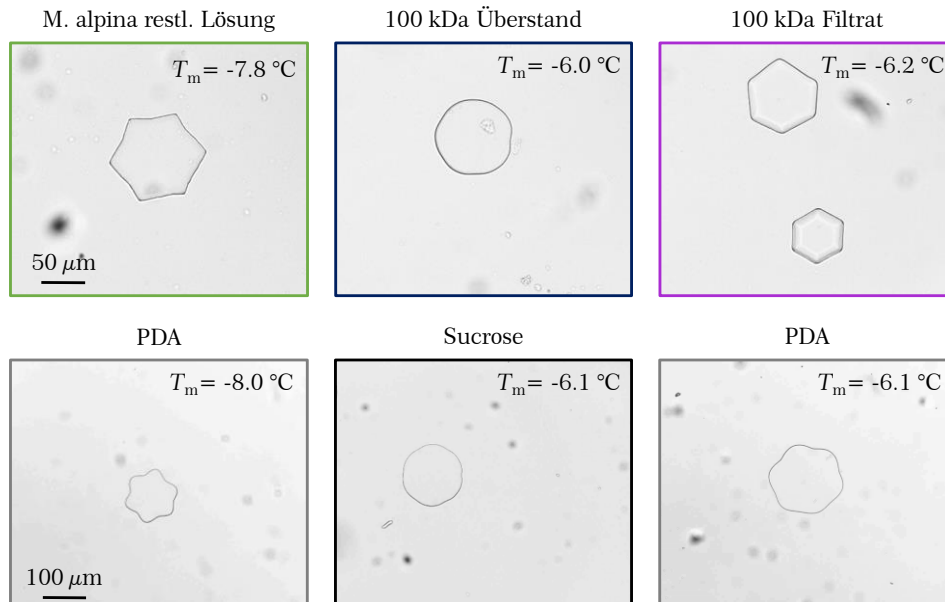


Abbildung 3.28: In der 100 kDa-Überstandslösung (blau; 33 Gew% Sucrose) der *M. alpina*-Restlösung (grün) aus der Aufreinigung 2016 ist keine Eisstrukturierung, die über das leichte dendritische Wachstum in der konzentrierten Sucroselösung mit einem ähnlichen Schmelzpunkt von -6 °C (schwarz) hinaus geht, zu beobachten. Dagegen zeigt sich in der Filtratlösung (rot) eine deutliche Strukturierung der Eiskristalle. Die Eiskristalle in den Referenzmessungen in PDA 2018-Lösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (grau) und in einer 45 Gew%-igen Sucroselösung weisen eine geringere Strukturierung durch dendritisches Wachstum auf. Die Messungen wurden bei einer Kühlrate von -0.01 °C min^{-1} durchgeführt.

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass der Eisnukleator mit einer Größe von $> 100\text{ kDa}$ zwar eisbindenden Charakter besitzt, aber nicht für die Eisstrukturierung und damit die Eisrekristallisationsinhibierung verantwortlich ist. Diese Effekte werden durch ein kleineres Molekül $< 100\text{ kDa}$ hervorgerufen.

Vermutet werden kann ein Zusammenspiel zwischen dem Eisnukleator und den an bestehende Eiskristalle adsorbierenden und deren Rekristallisation inhibierenden kleineren Antigefrier-molekülen, die für die Gefriertoleranz des Pilzes essentiell sind. Dass der Eisnukleator keine nachweisliche Eisstrukturierung zeigt, kann auf dessen wesentlich geringere Konzentration zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den Antigefrier-molekülen, die in Kooperation mit weiteren Molekülen das Wachstum eines Eiskristalls hemmen, ist ein einziges eisnukleierendes Molekül für das Gefrieren einer Probe ausreichend. Dagegen kann die nicht detektierte Eisnukleationsaktivität des eisstrukturierenden Moleküls auf dessen sehr kleine Größe zurückgeführt werden, weshalb die Nukleationstemperatur unterhalb des Detektionslimits der hier verwendeten Messgeräte zu vermuten ist (s. auch [Kapitel 3.4](#)).

3.2.3. IR-Analytik an *M. alpina*

Durch die an *M. alpina* angewendete Eisaffinitätsaufreinigung wurden spezifisch eisbindende Moleküle aus der Stammlösung extrahiert. Die in [Abbildung 3.29](#) dargestellten IR-Spektren der aufgereinigten IAP-Lösungen (2016: hellblau; 2017: blau) zeigen tatsächlich, dass aus dem Molekülgemisch der Stammlösung (rot) ein oder mehrere spezifische Moleküle gewonnen wurden. Die Lösung kann neben dem Eisnukleator und dem Antiegefrieremolekül noch Spuren weiterer Moleküle enthalten, da die Aufreinigungsprozedur nur einmal durchlaufen wurde. Aufgrund der Spezifität der IAP für eisbindende Moleküle werden diese beiden Moleküle jedoch den Hauptbeitrag zu dem Spektrum liefern. Das sehr breite und unstrukturierte Bandenmuster der Stammlösung weist auf das Vorhandensein von Proteinen (1700 - 1500 cm^{-1} ; rot markierter Bereich) sowie von Zuckern (1200 - 1000 cm^{-1} ; grün markierter Bereich) hin ([Tabelle A.7](#)). Beide IAP-Spektren gleichen sich im Bandenmuster und unterscheiden sich nur in der Signalintensität etwas. Dieses deutet auf Reproduzierbarkeit der Aufreinigung und auf spezifischen eisbindenden Charakter der zu dem Spektrum beitragenden Moleküle hin. Unter der Annahme, dass das eisnukleierende Molekül nur sehr gering konzentriert vorliegt (s. auch UV-VIS-Spektrum im [Anhang A.10.2](#)), resultiert das Spektrum der IAP-Probe zu einem Hauptteil aus dem Antiegefrieremolekül. Dieses ist demnach der Stoffklasse der Polysaccharide zuzuordnen, da es bei 1120, 1097 und 1077 cm^{-1} im charakteristischen Bereich der C-O-Valenzschwingungen (grün markierter Bereich) absorbiert. Die beiden prägnanten Banden bei 1600 und 1400 cm^{-1} könnten analog zu den Spektren des Birkenpollenwaschwassers auf die antisymmetrische und symmetrische Bande einer Carboxylatgruppe (gelb markierter Bereich) zurückgeführt werden, was auf ein Polysaccharid mit anionischen Gruppen als Antiegefrieremolekül schließen ließe.

Die Referenzspektren der PDA-Lösungen (2016: orange; 2018: grau) weisen im Zuckerbereich zwar zum Teil gleiche Absorptionsbanden (1077 und 1050 cm^{-1}) wie *M. alpina*-Proben, aber ein im Gesamten abweichendes Bandenmuster auf, sodass ein bedeutender Beitrag des Nährbodens zu den Probenspektren ausgeschlossen werden kann. Dass sich beide PDA-Spektren im Zuckerbereich in der Bandenintensität ein wenig voneinander unterscheiden (2016: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 1097 \text{ cm}^{-1}$; 2018: $\tilde{\nu}_{\text{max}} = 1020 \text{ cm}^{-1}$), lässt sich mit der unterschiedlichen Präparation der Lösungen erklären. Während die PDA 2016-Lösung durch Lösen einer definierten Menge des PDA-Gels in Wasser angesetzt wurde, wurde die PDA 2018-Lösung durch Abwaschen des Gels hergestellt, wodurch die Komponenten in ihrer relativen Konzentration zueinander variieren mögen.

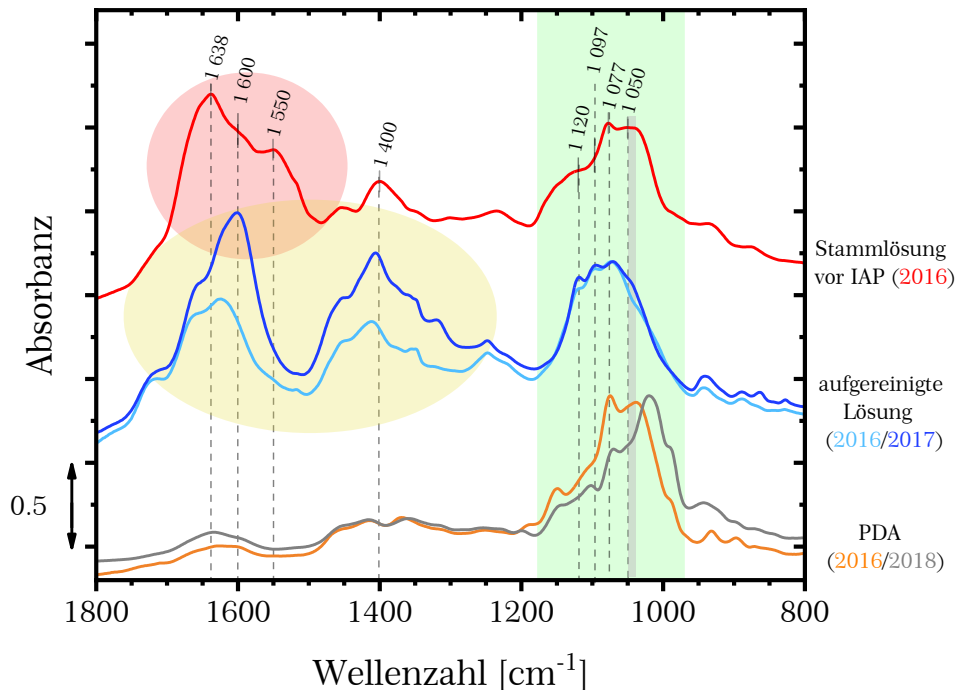


Abbildung 3.29: IR-Spektren der *M. alpina*-Lösung (rot) sowie der aufgereinigten Lösungen beider IAP-Prozeduren (2016: hellblau; 2017: blau) und der Nährboden-Lösungen (2016: orange; 2018: grau) als Referenz. Während das Spektrum des Pilzextraktes ein verschmiertes Bandenmuster aufweist mit andeutungsweisen Protein- (rot markierter Bereich) und Zuckerbanden (grün markierter Bereich), sind die Spektren der IAP-Lösungen deutlich differenzierter. Deren Ähnlichkeit zeigt zudem die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung auf. Die Spektren sind auf die Absorptionsmaxima im Zuckerbereich um 1070 cm⁻¹ normiert.

Es konnte in [Abschnitt 3.2.2](#) gezeigt werden, dass der Eisnukleator in einem 100 kDa-Zentrifugenfilter aufgehalten werden kann, während das Molekül mit Antieisfrierereigenschaften den Filter passiert. Diese Eigenschaft wurde ausgenutzt, um über IR-Spektroskopie weitere Informationen bezüglich der Struktur des Eisnukleators zu erhalten. Aufgrund der nicht eindeutigen Interpretation der Überstandsspektren in Zusammenhang mit dem SDS-PAGE-Gel und UV-VIS-Spektrum werden diese Daten im [Anhang A.10](#) präsentiert. Das Überstandsspektrum zeigt ein für Glykoproteine typisches Bandenmuster. Da die Probe nach Auswertung der Gele jedoch mehrere Proteine enthält, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, welche Banden im IR-Spektrum von dem Eisnukleator stammen. Die Frage nach der Molmasse oder dem Charakter des eisnukleierenden Moleküls konnte nicht abschließend klären, sondern im Gegenteil sind mehr Fragen aufgeworfen worden. Es kann demnach nicht sicher gesagt werden, ob es sich bei dem eisnukleierenden Molekül in *M. alpina* um ein Protein mit einer Masse größer als 100 kDa oder um eine andere Substanzklasse handelt oder es sich durch Zusammenschluss kleinerer Moleküle bildet. Daher wurde ergänzend eine Größenausschlusschromatographie mit dem Ziel durchgeführt, anschließend die Fraktionen im Massenbereich zwischen 100 und 300 kDa bezüglich der Eisnukleationsaktivität und spektroskopisch zu untersuchen. Allerdings ergaben zwei durchgelaufene Proben verschiedener

Konzentrationen unterschiedliche Chromatogramme, sodass eine klare Einteilung der Molmassen nicht möglich war. Die Tatsache, dass eine erhöhte Konzentration der *M. alpina*-Lösung ein scheinbar verbreitertes und verschmiertes Chromatogramm ergab mit dem zu der Fraktion 100-300 kDa gehörenden Maximum bei einem höheren Elutionsvolumen, könnte mit an das Säulenmaterial adsorbierenden Molekülen in Zusammenhang gebracht werden. Dieses wiederum könnte auf ein Glykoprotein oder einen Zucker hindeuten. Ein Weiterverfolgen dieses Experiments mit einem ungewissen weiteren Verlauf am Ende der Arbeit hätte deren zeitlichen Rahmen gesprengt und wurde daher fallen gelassen.

3.2.4. Zusammenfassung *M. alpina*

Die in dieser Arbeit durchgeführten DSC-Experimente bestätigen die vorherigen Ergebnisse von Pummer et al. (2015) und Fröhlich-Nowoisky et al. (2015) dass die Pilzsporen von *M. alpina* bei -6 °C nukleierende molekulare Eiskeime mit einer Größe von mindestens 100 kDa enthalten. Zudem konnte in Emulsionsmessungen gezeigt werden, dass Borat die Nukleationsaktivität herabsetzt, sodass auf Zuckerfunktionalitäten in dem Eisnukleator geschlossen werden kann. Da ein Einfluss von Guanidiniumchlorid nicht spezifisch für ein Protein ist (Stank, 2018) und hier kein eindeutiges Ergebnis bezüglich des Einflusses auf die Nukleationsaktivität erhalten wurde, wurde stattdessen die IR-Spektroskopie zur genaueren Strukturidentifizierung herangezogen. Tatsächlich weist das Spektrum des 100 kDa-Überstands aus dem Zentrifugenfilterexperiment mit Eisnukleationsaktivität auf ein Glykoprotein hin. Allerdings ist diese Aussage mit Vorsicht zu behandeln, da die Probe trotz mehrmaligen Waschens mehrere Proteine enthielt, wie aus den SDS-PAGE-Gelen zu entnehmen ist.

Die Antigefriereigenschaften von *M. alpina* in Form von Eisstrukturierung und (mäßiger) Eisrekristallisationsinhibierung konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Zentrifugenfilterexperimente lieferten hier eine Größe von weniger als 100 kDa bei einem gleichzeitigen Verlust der Eisnukleationsaktivität, weshalb das Antigefrieremolekül nicht identisch mit dem Eisnukleator sein kann. Auch hier zeigt sich analog zu den Birkenpollen die Größe des Moleküls mit eisbindendem Charakter als entscheidender Faktor für die vorrangige Eigenschaft.

Das IR-Spektrum der aufgereinigten Probe lässt ein, möglicherweise carboxyliertes, Polysaccharid als Antigefrieremolekül vermuten, da dessen Konzentration die des ebenfalls eisbindenden Eisnukleators deutlich übersteigt und es daher hauptsächlich zu dem Spektrum beiträgt.

3.3. Antigefrierprotein aus *Tenebrio molitor*

Das hyperaktive Antigefrierprotein aus der Mehlkäferlarve des *Tenebrio molitor* (TmAFP) wurde in der Arbeitsgruppe von I. Braslavsky (Hebräische Universität von Jerusalem, Rechovot, Israel) rekombinant hergestellt. Dazu wurde ein MBP-His6-TmAFP (MBP: Maltose-bindendes Protein; His6: Histidinsequenz) enthaltendes Plasmid in einen *E. coli*-Stamm überführt und wachsen gelassen (Eickhoff et al., 2018). Die letzten Schritte der Präparation umfassten die Aufreinigung des Fusionsproteins aufgrund der Affinität von His6 an eine Nickel-Nitrilotriessigsäure-Säule (Ni-NTA) und anschließendes Umpuffern mit dem Puffer PBS (phosphate buffered saline; s.u.). Die beiden Proteine sind überdies über die Sequenz ENLYFQG verknüpft (Choi, 2007), um mit der sequenzspezifischen TEV-Protease (TEV: tobacco etch virus, Tabakmosaikvirus) das MBP von dem MBP-TmAFP abzuspalten und das TmAFP zu erhalten. Wegen der Affinität des MBP-His6 an die Ni-NTA-Säule konnte ungebundenes TmAFP gesammelt und mit PBS umgepuffert werden. Der PBS-Puffer wurde in derselben Arbeitsgruppe in einer zehnfachen Konzentration (PBSx10) aus NaCl (10 x 137 mM), KCl (10 x 2.7 mM), Na₂HPO₄ (10 x 4.3 mM) und KH₂PO₄ (10 x 1.4 mM) in Wasser angesetzt und anschließend bei Gebrauch verdünnt (PBSx1) (Braslavsky, 2018). Der pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH auf 7.4 eingestellt.

Das MBP wird häufig in der Proteinexpression als Fusionsprotein verwendet, da dieses zu einer erhöhten Löslichkeit und geringeren Aggregationstendenz des Zielproteins führt. Zudem wird die Aufreinigung durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie über das His6-Tag erleichtert. Dieses Protein hat eine Molare Masse von ~41 kDa, das TmAFP von 8.4 kDa (Digitale Proteindatenbank), sodass für das MBP-TmAFP ein näherungsweise Molekulargewicht von 50 kDa angenommen wird. Das MBP-TmAFP wurde mit einer Massenkonzentration von 1.6 mg ml⁻¹ (32 μM) in PBS und von dem TmAFP wurden 0.8 mg ml⁻¹ (95.2 μM) in PBS erhalten. IR-Spektren der Proteinlösungen in dem Puffer (nicht gezeigt) bestätigen, dass die Proteine in dem Phosphatpuffer gelöst sind. Im [Anhang A.7.3](#) sind die IR-Spektren der beiden Proteine in Wasser gezeigt.

Wie die Schmelzkurven in den DSC-Thermogrammen in [Abbildung 3.30](#) zeigen, ist die Schmelzpunkterniedrigung durch den Puffer in der MBP-TmAFP-Lösung (rot) weniger stark ausgeprägt als in der TmAFP-Lösung (schwarz) und in dem verwendeten Puffer (grau) selbst, die beide den gleichen Schmelzpunkt aufweisen. Daraus kann auf einen geringeren Pufferanteil in der MBP-TmAFP-Lösung geschlossen werden. Aufgrund der moderaten Schmelzpunkterniedrigung ist weder die Onset- noch die Wendepunkttemperatur zur quantitativen Interpretation geeignet. Wird [Gleichung \(2.24\)](#) zur groben Abschätzung des erwarteten Schmelzpunktes der Pufferlösung PBSx1 herangezogen, ergibt sich ein Schmelzpunkt von ~ -0.55 °C, der damit dem der MBP-TmAFP-Lösung am nächsten kommt.

Dieses lässt den Schluss zu, dass sowohl die Pufferlösung als auch die gleichzeitigmitgelieferte TmAFP-Lösung einen höheren Puffergehalt hatten als gewünscht, während die Konzentration in der MBP-TmAFP-Lösung erwartungsgemäß der in dem PBSx1-Puffer entsprach. Weiterführende Messungen von L. Eickhoff ließen die Pufferkonzentration in der TmAFP-Lösung auf PBSx2.7 abschätzen (Eickhoff et al., 2018).

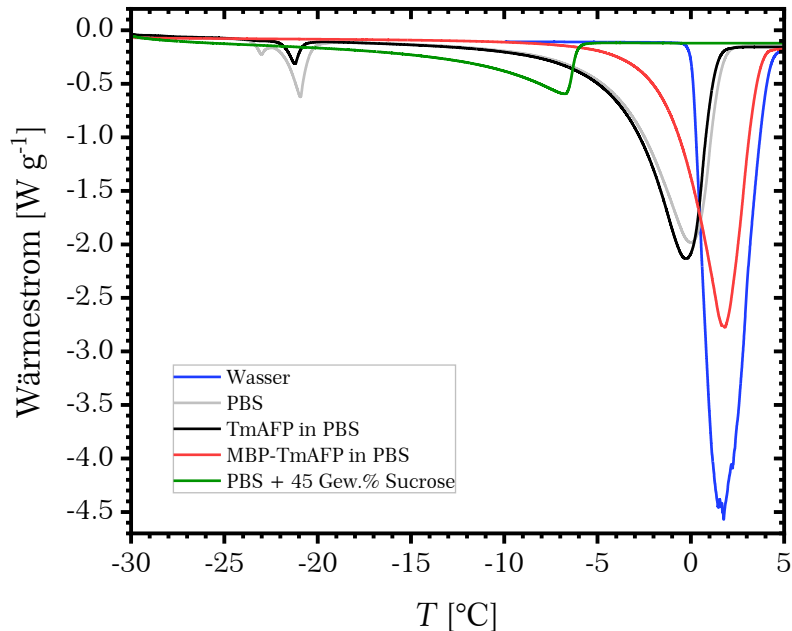


Abbildung 3.30: Der Ausschnitt aus den DSC-Thermogrammen von verschiedenen bulk-Proben zeigt die unterschiedlichen Schmelztemperaturen und damit Pufferkonzentrationen der Proteinlösungen mit MBP-TmAFP (rot) und TmAFP (schwarz), dessen Schmelztemperatur der des reinen Puffers (grau) entspricht, auf. In einer 45 Gew%-igen Sucroslösung verschwinden die eutektischen Übergänge.

Es wurden beide Proteine bezüglich der eisrekristallisationsinhibierenden Eigenschaften (IRI) in einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der effektiven Konzentration c_i vermessen. Diese Ergebnisse stellen in der in Vorbereitung stehenden Publikation von Eickhoff et al. (2018) erstmalig veröffentlichte IRI-Daten von TmAFP dar. Desweiteren wurden diese Proteine als Testsubstanzen zur Einführung und zum Aufbau einer mikroskopischen Messmethode zur Bestimmung der Thermischen Hystereseaktivität (TH) und dessen Konzentrations- und Zeitabhängigkeit verwendet. Da das TmAFP schon häufig bezüglich der TH-Aktivität (Hansen, T. N. and Baust, J. G., 1988, 1989; Scotter et al., 2006; Bar et al., 2008; Marshall et al., 2002; Drori et al., 2014; Olijve et al., 2016a) und u.a. mit dem etablierten und deutlich sensitiveren Nanoliter-Osmometer (Braslavsky and Drori, 2013) untersucht wurde, ist dieser Abschnitt der Arbeit nicht Teil der oben genannten Publikation. Dagegen sind die Resultate aus den mit Unterstützung von L. Eickhoff durchgeführten Eisnukleationsmessungen am Mikrofluidik-Messgerät besonders Aufsehen erregend. Durch weitere umfangreiche Experimente von L. Eickhoff ergänzt, welche daher nicht Einzug in diese Arbeit halten, sind sie Hauptbestandteil der Publikation.

3.3.1. Eisrekristallisationsinhibierung von TmAFP

Die Proteine MBP-TmAFP und TmAFP wurden als wässrige Lösungen in dem Puffer PBS erhalten. Um einerseits eine Vergleichbarkeit mit früheren IRI-Messungen an dem Messgerät der Arbeitsgruppe (Budke, C. and Koop, T., 2006; Budke et al., 2009; Budke, 2010; Budke et al., 2014) zu gewährleisten und andererseits mögliche Einflüsse des Puffers auszuschließen, wurden die Lösungen mit Wasser (TmAFP; MBP-TmAFP#) bzw. einer 45 Gew%-igen Sucroslösung (MBP-TmAFP§) jeweils über einen 5 kDa-Filter umgepuffert. Die nach der Prozedur in der Lösung vorliegenden Konzentrationen der Proteine wurden UV-VIS-spektroskopisch (**Abbildung A.17**) ermittelt. Es ergaben sich Konzentrationen von TmAFP in der 45 Gew%-igen Sucroslösung von 0.359 mg ml^{-1} ($42.7 \mu\text{M}$) und von MBP-TmAFP von 1.388 mg ml^{-1} ($27.8 \mu\text{M}$; §) bzw. 1.120 mg ml^{-1} ($22.4 \mu\text{M}$; #) (s. **Tabelle A.9**).

Für die Messreihen beider Proteine wurden die Referenzmessungen mit der jeweiligen zur Verdünnung genutzten Sucroslösung durchgeführt, die wie die Proteinlösungen zur Erhöhung der Haltbarkeit im Gefrierschrank gelagert wurde. Die IRI-Messungen wurden in 45 Gew% Sucrose bei $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ über einen Messzeitraum von 120 min durchgeführt. Für vier ausgewählte Konzentrationen und drei Zeitpunkte sind die dabei aufgenommenen Bilder am Beispiel der TmAFP-Messreihe in **Abbildung 3.31a** gezeigt. Aufgrund der Ostwaldreifung steigt generell der mittlere Radius der Kristalle in den polykristallinen Eisfilmen. Mit zunehmender Proteinkonzentration ist sowohl eine Strukturierung der Eiskristalle erkennbar, was eine Adsorption des TmAFP anzeigt, als auch eine Abnahme der mittleren Kristallgröße, die aus einer größeren Anzahl kleinerer Kristalle als bei der Referenzmessung (grau) resultiert. Bei der höchsten TmAFP-Konzentration (0.358 mg ml^{-1} ; schwarz) ist der Großteil der Kristalle nicht detektierbar gewachsen.

Für die vier Messungen ist in **Abbildung 3.31b** die zeitliche Entwicklung des kubischen mittleren Radius r^3 dargestellt. Dabei gehören die Messkurven zu den mit derselben Farbe markierten Bildsequenzen in a). Nach der LSW-Theorie (**2.38**) geben die Steigungen der Geraden die Ratenkonstanten des jeweils geschwindigkeitsbestimmenden Prozesses an. Im Fall der Referenzmessung mit der 45 Gew%-igen Sucroslösung entspricht die Steigung der diffusionslimitierten Ratenkonstante k_d und weist den höchsten Wert auf. Mit steigender TmAFP-Konzentration nimmt die Steigung durch zunehmende Hemmung der Ostwaldreifung ab, bis sie bei der höchsten Konzentration ($358 \mu\text{g ml}^{-1}$; schwarz) nahezu Null wird, was auf eine vollständige Eisrekristallisationsinhibierung zurückzuführen ist. Bei der Messreihe mit moderater Proteinkonzentration ($35.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ (blau)) ist ein Abknicken der Kurve bei 55 min erkennbar. Zu diesem Zeitpunkt kommt es zu einem Wechsel von Diffusionskontrolle zu Wachstumsinhibierung, d.h. dass die erste Steigung k_d entsprechen sollte und aus der zweiten Steigung die wachstumsinhibierte Ratenkonstante k_i erhalten wird. Aufgrund der moderaten Menge an eisadsorbierenden Proteinen tritt der hemmende Effekt erst zu einem späteren Zeitpunkt auf, wenn die Gesamtoberfläche der Kristalle durch die Ostwaldreifung

gesunken ist, sodass der Anteil adsorbierter Moleküle pro Oberfläche steigt und der Einbau weiterer Wassermoleküle in die Kristalle nun die Geschwindigkeit der Rekristallisation bestimmt. Zum besseren Vergleich der vier Messungen untereinander werden Messungen mit vergleichbarem Eisanteil Q gezeigt, da die Geschwindigkeit der Rekristallisation eine Abhängigkeit vom Eisanteil aufweist.

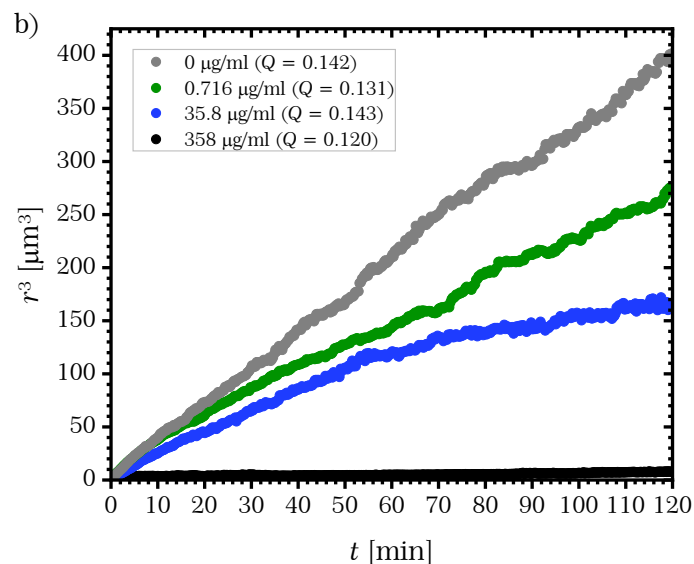
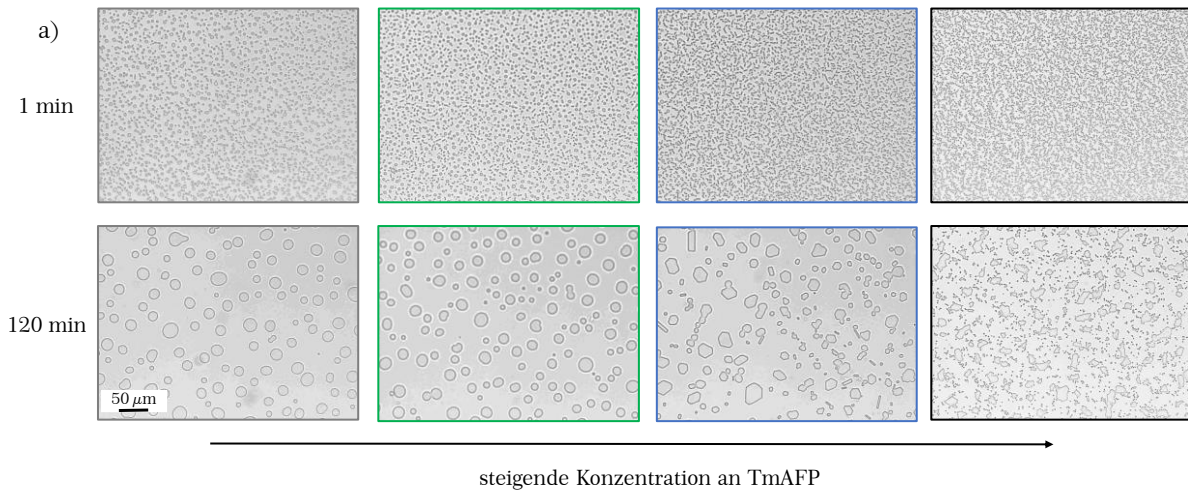


Abbildung 3.31: Rekristallisationsmessungen bei -8 °C und nahezu gleichem Eisanteil Q verschieden konzentrierter TmAFP-Lösungen (Legende in b)), jeweils mit 45 Gew.% Sucrose. a) Aufgenommene Bilder nach 1 min, 10 min und 120 min (von oben nach unten) für vier beispielhafte Konzentrationen. b) Nach der LSW-Theorie ergibt sich ein linearer Verlauf des mittleren kubischen Kristallradius r^3 in Abhängigkeit von der Zeit t , dessen Steigung durch die jeweilige Ratenkonstante des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes angegeben wird. Die Bilder mit farbigem Rahmen in a) sind aus der in b) dargestellten Messung derselben Farbe entnommen. Während die mittlere Kristallgröße zu Beginn bei allen Konzentrationen sehr klein ist steigt sie mit zunehmender Konzentration an rekristallisationsinhibierendem AFP über die Zeit weniger stark an, was sich dementsprechend in einer kleineren Steigung von $r^3(t)$ äußert. Bei mittleren Konzentrationen (hier dargestellt am Beispiel von $35.8 \mu\text{g ml}^{-1}$ (blau)) ist ein Wechsel von Diffusionskontrolle zu Wachstumsinhibierung bei 55 min zu sehen, der sich in der Strukturierung der Eiskristalle äußert. Bei hohen Konzentrationen an TmAFP ($358 \mu\text{g ml}^{-1}$ (schwarz)) kommt es zur fast vollständigen Hemmung der Rekristallisation, da der Großteil der Kristalle keine Änderung in der Größe erfährt, sodass auch die Steigung von $r^3(t)$ zu vernachlässigen ist.

Bei den Messungen mit vollständiger Inhibierung ist eine ungewöhnliche Beobachtung zu machen, die aus den bisherigen Messungen in der Arbeitsgruppe an moderaten AF(G)Ps nicht bekannt war: einige der Kristalle wachsen amöbenartig und scheinbar unkontrolliert, wie die Bildsequenz in **Abbildung 3.32** hervorhebt, während die übrigen Kristalle in diesem Bildausschnitt vollständig im Wachstum gehemmt sind. Interessanterweise ist dieses Verhalten bei mittleren Konzentrationen nicht mehr beobachtbar, ebenso nicht in der MBP-TmAFP-Messreihe bei höheren Massenkonzentrationen ($> 0.7 \text{ mg ml}^{-1}$). Das amöbenähnliche Wachstum kann mit dem bei der Hysteresegefriertemperatur auftretenden explosiven Wachstum verglichen werden, wie in den Hysterese-messungen, die in **Kapitel 3.3.2** gezeigt sind, beobachtet wurde. Dieses Phänomen könnte im Zusammenhang mit dem hyperaktiven Charakter der Proteine stehen, der sich u.a. in einer langsameren Akkumulation der Moleküle an den basalen Eisflächen äußert (Drori et al., 2014), wodurch die Eiskristalle zunächst noch nicht vollständig belegt sind und das vollständige Stoppen des Eiskristallwachstums erst nach etwa 30 Minuten eintritt.

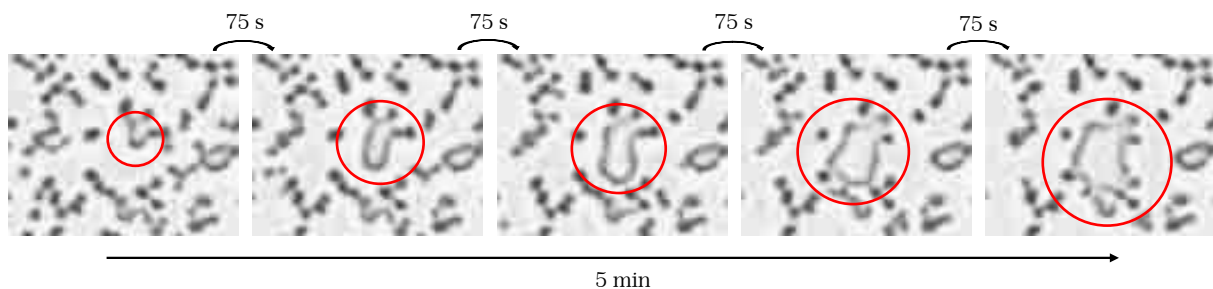


Abbildung 3.32: Die Bildsequenz aus einer IRI-Messung mit TmAFP ($358 \mu\text{g ml}^{-1}$) umfasst 5 Minuten in Abständen von 75 Sekunden und zeigt das ungewöhnliche amöbenartige Wachstum eines Eiskristalls im Verlauf der Zeit, während die weiteren Kristalle im Wachstum vollständig gehemmt sind.

Ein Einfluss von restlichem Phosphatpuffer, der durch die Umpufferung eine um den Faktor 10^3 geringere Konzentration haben müsste, kann bei Betrachtung der DSC-Thermogramme ausgeschlossen werden (**Abbildung 3.30**). Der Puffer weist in seiner ursprünglichen Konzentration zwar eutektische Übergänge auf, die allerdings in der 45 Gew%-igen Sucroselösung verschwinden. Zudem wurde in einer IRI-Messung mit dem reinen Puffer (Daten nicht gezeigt) keine derartige Beobachtung gemacht.

Die ermittelten Ratenkonstanten k_{10} (detaillierte Beschreibung s. **Anhang A.2**) ergeben einen sigmoidalen Verlauf in Abhängigkeit von der logarithmisch skalierten Konzentration (s. **Abbildung 3.33**). Die Anpassung an die einzelnen Datenpunkte (offene Symbole) statt der Mittelwerte (geschlossene Symbole), um die Streuung besser widerzugeben, mit der Hillfunktion (2.41) liefert über den Wendepunkt die effektive Konzentration c_i von TmAFP und MBP-TmAFP (**Tabelle 3.8**). Hierbei wurde der für die zu der jeweiligen Messreihe gehörende Sucrose-Referenzmessung berechnete k_{d0} -Wert in der Anpassungsfunktion als fixer Parameter gesetzt.

Auf molarer Ebene ist das sechsmal schwerere MBP-TmAFP ($c_i = 0.49 \mu\text{M}$) etwas effektiver in der Inhibierung der Rekristallisation als das kleinere TmAFP ($1.62 \mu\text{M}$).

Beide Proteine haben die gleiche eisbindende Stelle, sodass bei gleicher Stoffmenge die IRI-Aktivität des Proteins von der Größe des Rückgrats bestimmt wird, wie in (Bar Dolev et al., 2016b) am Beispiel der TH-Aktivität einiger AFPs gezeigt ist. Dagegen ist bezüglich der Massenkonzentration das TmAFP das aktivere Protein ($c_i = 13.6 \mu\text{g ml}^{-1}$; MBP-TmAFP: $24.7 \mu\text{g ml}^{-1}$).

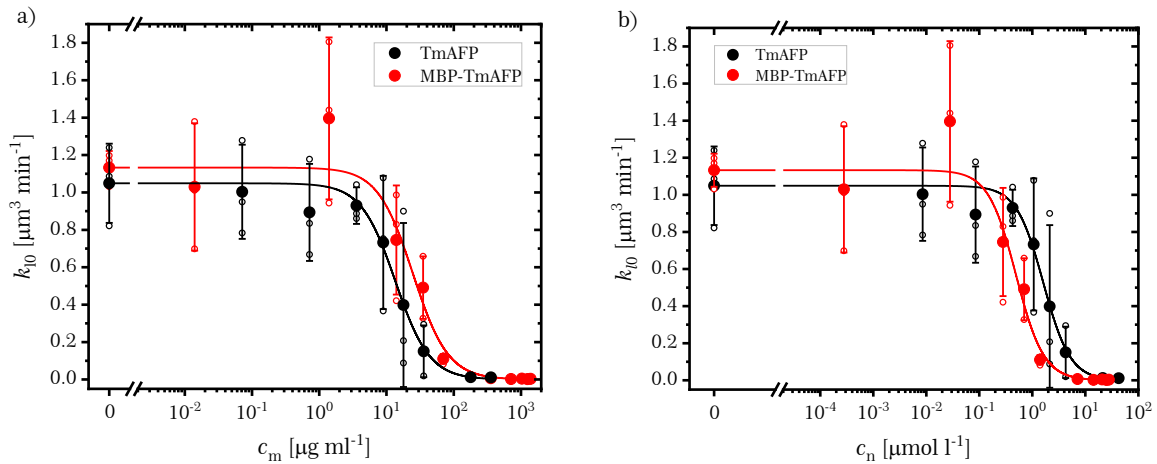


Abbildung 3.33: Eisanteilkorrigierte Ratenkonstanten k_{10} in Abhängigkeit von der a) Massenkonzentration c_m und b) der molaren Konzentration c_n an TmAFP (schwarz) und MBP-TmAFP (rot) mit Standardabweichungen als Fehlerbalken. Bezüglich der Massenkonzentration (a) ist die IRI-Aktivität von MBP-TmAFP schwächer als von TmAFP, die sich auf molarer Ebene (b) umkehrt. Die Wendepunkte der Hill-Anpassungskurven (2.41) liefern die die Aktivität beschreibende charakteristische Größe c_i (s. Tabelle 3.8).

In einer nicht veröffentlichten Messung aus der Arbeitsgruppe von I. Braslavsky (Zalis, 2015) konnte bei einer Messtemperatur von $-6 \text{ }^\circ\text{C}$ eine deutlich höhere Effizienz des TmAFP mit $c_i = 0.03 \mu\text{M}$ nachgewiesen werden. Bei einer höheren Messtemperatur wäre allerdings eine geringere IRI-Aktivität zu erwarten, wie Budke (2010) am Beispiel eines Oligopeptids gezeigt hat. Auffällig sind bei Zalis (2015) die hohen Werte für k_{10} von $\sim 10 \mu\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$ im diffusionskontrollierten Konzentrationsbereich, denn der Wert für k_{LSW} sollte bei einer Messtemperatur von $-6 \text{ }^\circ\text{C}$ bei $1.38 \mu\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$ liegen (Budke et al., 2009).

Es wäre in Betracht zu ziehen, dass das Protein TmAFP bei der Lieferung, als es über mehrere Tage im Zoll und anschließend in der uninterne Hauspost bei Raumtemperatur feststeckte, geschädigt wurde, sodass eine zu geringe Aktivität gemessen wurde. Allerdings wäre dann zu erwarten, dass das MBP-TmAFP, dessen Versand reibungslos ablief, eine höhere Aktivität aufweist als das TmAFP. Auch ein Konzentrationsfehler wird eher ausgeschlossen, da beide Proteine mit derselben aktiven Stelle eine Aktivität in derselben Größenordnung aufweisen. Dem IR-Spektrum von TmAFP in Wasser (Abbildung A.16) kann entnommen werden, dass eine Phosphorylierung des Proteins vorliegt, die u.a. die Hydroxylgruppen tragende Aminosäure Threonin betrifft (s. auch Anhang A.7.3). Da Threonin für die eisbindende Eigenschaft des Proteins essentiell ist (s. Kapitel 2.3.5.1), kann eine Beeinflussung dieser Phosphorylierung auf die Aktivität als Eisrekristallisationsinhibitor vermutet werden. Ein direkter Vergleich mit den Daten von Zalis (2015) ist jedoch erschwert,

da keine Informationen über den Phosphorylierungsgrad in deren verwendeten TmAFP vorliegen. Die große Differenz in der Aktivität über zwei Größenordnungen scheint etwas zu hoch, um darüber erklärt werden zu können.

In dem IR-Spektrum von MBP-TmAFP ist die entsprechende Bande zwar nicht zu detektieren, was im Zusammenhang mit dem geringen Beitrag von TmAFP an dem großen Protein stehen könnte, aus der vergleichbaren IRI-Aktivität ist aber eine ähnlich ausgeprägte Phosphatierung anzunehmen.

Tabelle 3.8: Für TmAFP und MBP-TmAFP aus der Anpassung in [Abbildung 3.33](#) über Gleichung (2.41) erhaltene c_i -Werte. Die hier gelisteten k_{d0} -Werte entstammen den zu der jeweiligen Messreihe gehörenden Referenzmessungen mit einer 45 Gew%-igen Sucroslösung nach Gleichung (2.40) (diese Arbeit) bzw. aus Zalis (2015).

	TmAFP	MBP-TmAFP	Zalis (2015)
c_i [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	13.58 ± 5.13	24.68 ± 8.14	0.243 ± 0.042
c_i [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	1.616 ± 0.610	0.494 ± 0.163	0.029 ± 0.005
k_{d0} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	1.049 ± 0.212	1.133 ± 0.089	~ 10

Mit den Werten für die effektive Konzentration c_i liegen sowohl das TmAFP als auch das MBP-TmAFP im moderaten Aktivitätsbereich und sind vergleichbar mit dem AFP III ($1.6 \mu\text{M}$), wie die aus Budke et al. (2014) entnommene und überarbeitete [Abbildung 3.34](#) erkennen lässt. Hier ist auch eine Molekülgrößenabhängigkeit der Eisrekristallisationshemmung am Beispiel anderer Polymere zu erkennen.

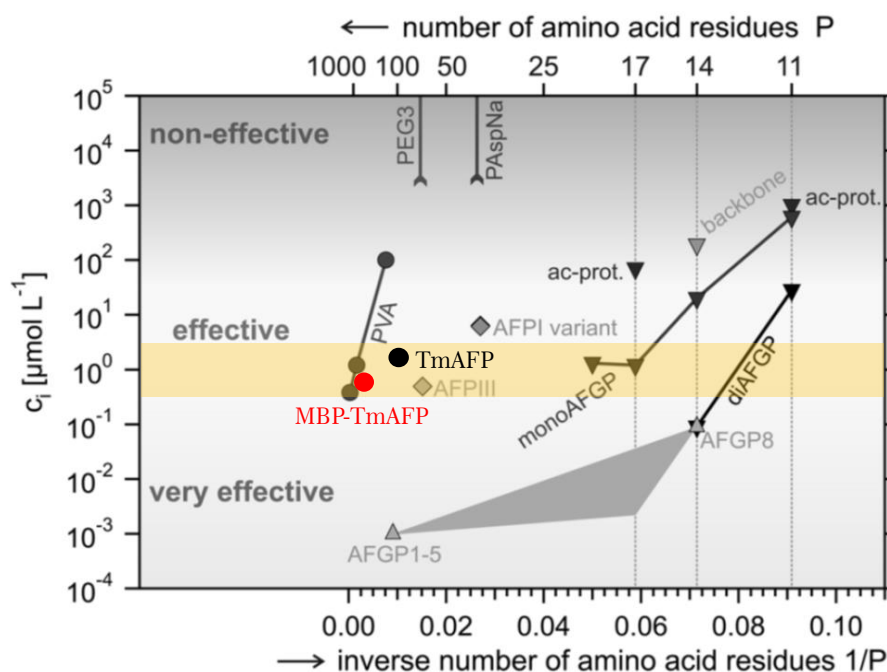


Abbildung 3.34: Dargestellt ist die effektive Konzentration c_i als Funktion der Molekülgröße, hier in Form der Monomereinheiten P. TmAFP (84 AS) und MBP-TmAFP (~370 AS) gehören zu den effektiven Antigefrierproteinen, deren Eisrekristallisationsaktivität in Form von c_i vergleichbar ist mit der von AFP III. Eine Größenabhängigkeit ist bei Molekülen mit derselben eisbindenden Stelle ((MBP-)TmAFP) oder derselben chemischen Struktur (PVA; AFGP) aufgezeigt. Die in schwarz-weiß gezeigte Graphik wurde mit Änderungen aus (Budke et al., 2014) entnommen.

3.3.2. Bestimmung der Thermischen Hysterese von TmAFP

Die Thermische Hystereseaktivität des hyperaktiven Antigefrierproteins TmAFP wurde in den vergangenen Jahren von zahlreichen Arbeitsgruppen mithilfe verschiedener technischer Geräte wie das auf optischer Beobachtung basierende Nanoliter-Osmometer (Marshall et al., 2002; Scotter et al., 2006; Bar et al., 2008; Drori et al., 2014) oder auch das Wärmestromkalorimeter zur Erfassung der freiwerdenden Kristallisationswärme am Hysteresegefrierpunkt (Hansen, T. N. and Baust, J. G., 1988, 1989) untersucht. In dieser Arbeit war das vorrangige Ziel daher weniger die Untersuchung des TmAFP bezüglich der TH-Aktivität, sondern der erstmalige Aufbau und die Erarbeitung einer geeigneten Messmethode zur optischen Bestimmung der TH an einem Kryomikroskop. In **Kapitel 2.4.5** und im **Anhang A.3** werden die angewandten Methoden zur Probenpräparation und TH-Messung detailliert beschrieben. Deren Anwendbarkeit und Ergebnisse am Beispiel von (MBP-)TmAFP werden in diesem Kapitel dargelegt und diskutiert.

Die Thermische Hysterese berechnet sich aus der Differenz der mit einem Temperaturfehler von 0.1 °C behafteten Schmelztemperatur eines Kristalls und dessen Gefriertemperatur bzw. Explosionstemperatur, die ebenfalls nur mit einer Genauigkeit von 0.1 °C bestimmt werden kann. In **Abbildung 3.35** sind die in dieser Arbeit gemessenen TH-Werte als Funktion der Konzentration des TmAFP in der PBS-Pufferlösung (PBSx2.7; schwarze Symbole) im Vergleich mit Werten aus der Literatur (farbige Symbole) eingetragen (s. auch **Tabelle 3.10**). Die hyperbolische Konzentrationsabhängigkeit ist wegen der geringen Datenmenge in dieser Arbeit nur anhand der Literaturdaten zu erkennen. Die schwarzen Punkte geben die Ergebnisse aus der Messmethode mit kontinuierlichem Kühlen mit einer konstanten Rate von -0.05 °C min⁻¹ oder -0.1 °C min⁻¹ wider (Methode i)). Dabei konnte innerhalb der Messgenauigkeit von ±0.14 °C kein Unterschied zwischen den beiden Kühlraten beobachtet werden, was im Einklang mit den Angaben in (Bar et al., 2008) ist, deren Experimente mit Raten von -0.04 °C min⁻¹ und -0.15 °C min⁻¹ ebenfalls ähnliche Ergebnisse lieferten. Eine Kristallgrößenabhängigkeit ist bei den zwischen 10 und 20 µm variierenden Kristallgrößen nicht zu beobachten.

Für eine Konzentration von ~0.26 mg ml⁻¹ wurde eine mittlere TH-Aktivität von 0.5 °C erhalten, die in der Literatur schon bei zehnmal niedrigeren Konzentrationen gemessen wurde. Diese Abweichung kann nicht alleine auf die Messbedingungen einschließlich der Kühlrate, der Kristallgröße oder der Temperaturungenauigkeit zurückzuführen sein. Es könnte auch hier die Phosphorylierung des Proteins (**Kapitel A.7.3**) für die geringere TH-Aktivität verantwortlich sein. Es ist anzunehmen, dass die in der Literatur verwendeten Proteine ebenfalls phosphatiert vorliegen. Eine Variation im Phosphorylierungsgrad könnte demnach Unterschiede in den TH-Aktivitäten bei gleichen Messbedingungen erklären. Ein Ausfallen des Proteins durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wird nicht vermutet, da keine Feststoffbildung beobachtet worden war (s. auch **Abbildung 3.37**), kann aber nicht vollständig ausgeschlossen

werden. Aufgrund der geringeren Temperaturnauigkeit des verwendeten Messgeräts (± 0.1 °C) im Vergleich mit einem Nanoliter-Osmometer (± 0.002 °C) konnten die Kristalle nicht so weit angeschmolzen werden, dass die enthaltenen Lufteinschlüsse verschwinden konnten. Die durch die poröse Struktur des Eiskristalls vergrößerte Oberfläche kann daher als eine weitere mögliche Erklärung für die geringeren TH-Werte angeführt werden. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit der TH-Aktivitäten mit Literaturwerten kann daher einerseits die Verwendung einer geringeren Kühlrate beim Generieren der Eisphase in Betracht gezogen werden, um das Ausmaß an Lufteinschlüssen in dem Kristall gering zu halten. Andererseits können die Lufteinschlüsse in den Kristallen durch (schnelles) Ausfrieren zu großen Kristallen geschlossen werden, bevor diese Kristalle dann für die TH-Messung wiederholt auf kleine Kristalle angeschmolzen werden.

Um die TH-Werte dieser Arbeit besser mit den Literaturdaten, die aus Messungen mit Haltephasen während der Kühlphase erhalten wurden, vergleichen zu können, wurde eine weitere Messmethode eingesetzt (Methode ii)), bei deren Ausarbeitung sich an der in Bar et al. (2008) beschriebenen Messprozedur orientiert wurde. Aufgrund der verlängerten Messzeit durch die Haltephasen vor Beginn und während der Kühlphase wurden höhere TH-Werte (schwarze Sterne in **Abbildung 3.35**) erhalten, die innerhalb der Fehlergrenzen mit einigen Literaturdaten übereinstimmen (s. auch **Tabelle 3.9**).

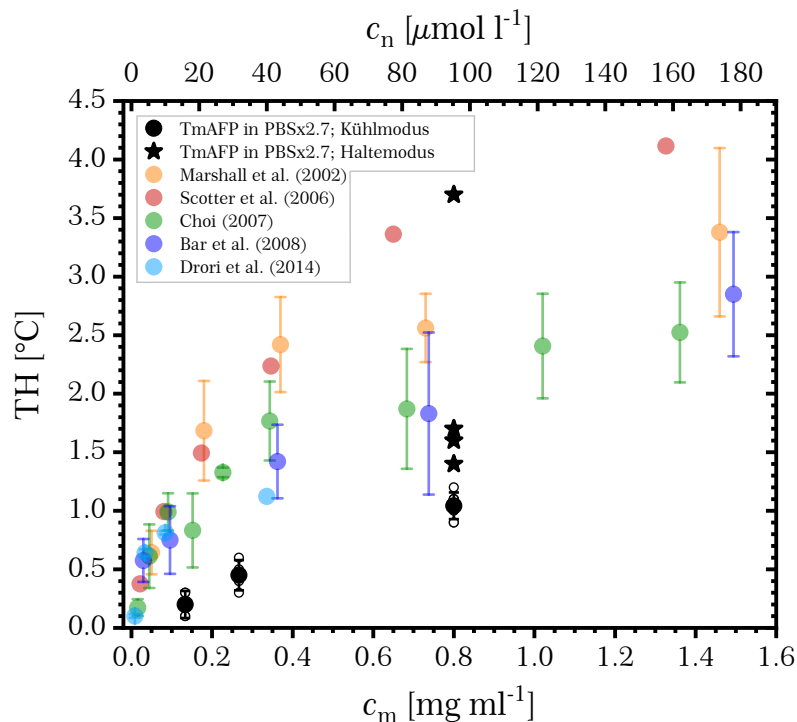


Abbildung 3.35: Thermische Hysterese von TmAFP-Lösungen unterschiedlicher Massen- (c_m ; untere x-Achse) und molarer (c_n ; obere x-Achse) Konzentrationen für die beiden in dieser Arbeit angewendeten Messmethoden. Die offenen Symbole zeigen die einzelnen Messwerte an, aus denen sich die Standardabweichungen, dargestellt als Fehlerbalken, und die Mittelwerte (geschlossenen Symbole) berechnen.

Dabei ist eine geringe Abhängigkeit sowohl von den Haltezeiten bzw. der gesamten Messdauer als auch von der Haltetemperatur knapp unterhalb der

Schmelztemperatur zu erkennen. Je länger die Messzeit durch längere Haltezeiten und je größer die Temperaturdifferenz der Haltetemperatur zur Schmelztemperatur ist, desto niedriger liegt die Hysteresegefrieretemperatur. Den Proteinen wird bei einer höheren Messzeit mehr Zeit zur Anlagerung an den Eiskristall gegeben, was sich bei hyperaktiven Proteinen, deren Akkumulation an die basale Fläche langsam verläuft (Drori et al., 2014), besonders bemerkbar macht. Bei einer niedrigeren Haltetemperatur steigt die Bindungsaffinität des AFP an den Eiskristall, da das Wasserkonstrukt in der Hydrathülle des Proteins eine geringere Dynamik aufweist und eisähnlicher wird, und damit auch die Akkumulationsrate.

Bei einer Messung wurde sogar eine sehr hohe TH-Aktivität von 3.7 °C gemessen, die sich um 2 °C von einer zweiten Messung (1.7 °C) mit denselben Messbedingungen unterscheidet. Eine mögliche Erklärung für diesen hohen Unterschied in der TH-Aktivität könnte einerseits die kleine Kristallgröße von etwa 5 μm im Vergleich zu dem 20 μm großen Kristall bei der Messung mit dem niedrigeren TH-Wert sein. Außerdem ist bei diesem Kristall eine geringe Porosität und damit geringe Oberfläche zu vermuten. Je kleiner der Kristall zu Beginn der Messung ist, desto schneller kann er durch die AFPs effizient bedeckt werden, was in einer tieferen Gefrieretemperatur resultiert. Eine Studie von (Takamichi et al., 2007) zeigte anhand des moderaten AFP III eine Kristallgrößenabhängigkeit der TH bei Messungen mit einer Kühlrate von $-0.01 \text{ °C min}^{-1}$ auf, die allerdings für eine Kühlrate von -0.2 °C min^{-1} vernachlässigbar war. Da es sich bei dem TmAFP um ein hyperaktives, sich langsam an den basalen Flächen ansammelndes Protein handelt, ist zu vermuten, dass die Kristallgröße auch bei einer etwas höheren Rate von -0.1 °C min^{-1} eine Rolle spielt.

Tabelle 3.9: Messbedingungen für die vier TH-Messungen der TmAFP-Stammlösung (0.8 mg ml^{-1}) nach Methode ii) im Vergleich mit denen in der Literatur. Die Haltetemperaturen bzw. -zeiten beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf die erste Haltephase vor Beginn des Kühlens. Die TH-Literaturdaten für 0.8 mg ml^{-1} wurden aus den Messkurven abgeschätzt. k. A. = keine Angabe.

TH [°C]	Kühlrate [°C min ⁻¹]	d_{kristall} [μm]	T_{halten} [°C]	$t_{\text{halten @}}$ T_{halten} [min]	$t_{\text{halten in}}$ Kühlphase [s]
1.4	-0.1	10	@ T_m	3	30
1.6	-0.1	?	@ T_m	3	30
1.7	-0.1	20	$0.2/0.3 < T_m$	10	10
3.7	-0.1	5	$0.2/0.3 < T_m$	10	10
(Marshall et al., 2002): ~2.8	-0.02 °C alle 15 s (-0.08 °C min ⁻¹)	k. A.	--	--	--
(Scotter et al., 2006): ~3.7	-0.0744	k. A.	--	--	--
(Choi, 2007): ~2	-0.01 °C alle 4 s (-0.15 °C min ⁻¹)	~20	--	--	--
(Bar et al., 2008): ~2	-0.15/ -0.04	10	$0.02 < T_m$	10	4
(Drori et al., 2014): ~1.5	-0.01 °C alle 4 s (-0.15 °C min ⁻¹)	10-15	$0.05 < T_m$	variabel	--

3.3.2.1 TH-Messungen an MBP-TmAFP

Die für das MBP-TmAFP erhaltenen TH-Werte (rote und violette Symbole in **Abbildung 3.36; Tabelle 3.10**) lassen den Rückschluss zu, dass dieses Protein sowohl bezüglich der Massenkonzentration als auch auf molarer Ebene deutlich stärker den Gefrierpunkt von Eiskristallen herab zu setzen vermag als das kleine TmAFP. Dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit der höheren IRI-Aktivität von MBP-TmAFP und steht auch hier im Zusammenhang mit der Größe des Moleküls bei gleicher eisbindender Stelle. Je ausladender das Molekül ist, desto kleiner wird der effektive Abstand zwischen einzelnen adsorbierten Molekülen, der bei einem kleineren Molekül größer wäre. Letztendlich folgt gemäß **Gleichung (2.34)** eine größere Hysterese bei großen Molekülen.

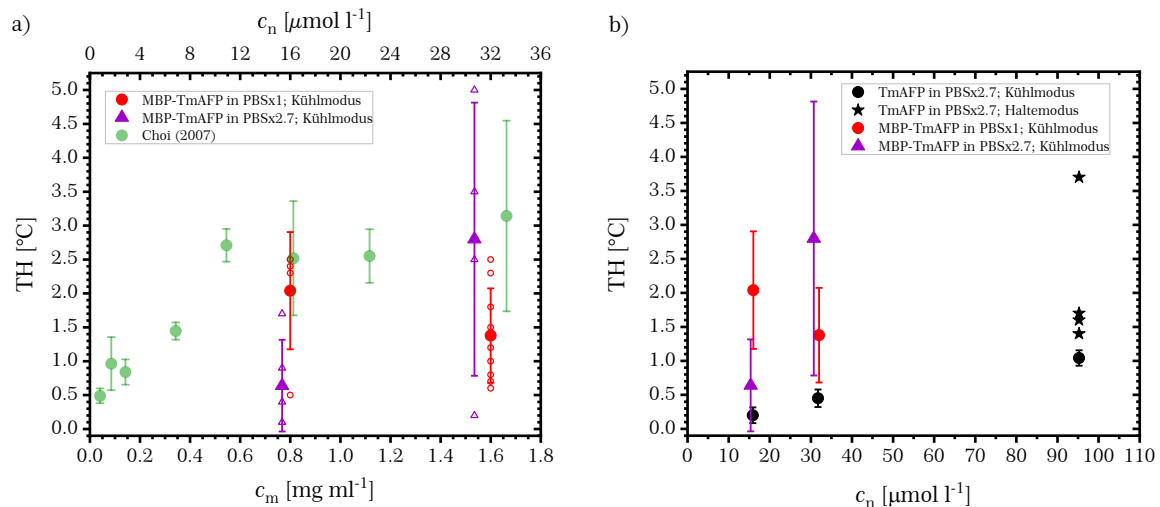


Abbildung 3.36: Thermische Hysterese von MBP-TmAFP in Abhängigkeit von der Konzentration. Angegeben sind die Werte der einzelnen Messungen (offene Symbole) mit Mittelwerten (geschlossene Symbole) sowie Standardabweichungen (Fehlerbalken). a) Vergleich der in dieser Arbeit gemessenen TH-Werte in PBSx1 (rot) und PBSx2.7 (violett) mit Werten aus einer Masterarbeit von (Choi, 2007) (grün). Die Erhöhung der Pufferkonzentration (violett) erhöht die Aktivität der Stammlösung ($\sim 1.6 \text{ mg ml}^{-1}$), nicht aber die der verdünnten Probe ($\sim 0.8 \text{ mg ml}^{-1}$). b) Generell ist trotz der großen TH-Streuung eine erhöhte TH-Aktivität des MBP-TmAFP gegenüber dem TmAFP auszumachen, wie der Vergleich bei gleichen molaren Konzentrationen (~ 16 und $\sim 32 \mu\text{M}$) zeigt.

Auffällig bei den MBP-TmAFP-Hysteresedaten ist die große Streuung der einzelnen Messwerte (offene Symbole), die durch die große Standardabweichung verdeutlicht wird. Auch die Daten aus einer Literaturquelle (Choi, 2007) zeigen bei der höchsten Konzentration ($\sim 1.65 \text{ mg ml}^{-1}$) eine große Streuung (**Abbildung 3.36a**). Dort wurde vermutet, dass diese Schwankungen aus der Schwierigkeit, Kristalle gleicher Größe zu generieren, resultierten. In dieser Arbeit war jedoch aufgefallen, dass das Protein in der Emulsion, die durch Schütteln des Wasser-Öl-Gemisches hergestellt wurde (Probenpräparationsmethode a)), sehr schnell denaturierte, was sich durch das Ausfallen eines weißen Feststoffes in dem Probengefäß nach nur wenigen Minuten bemerkbar machte. Teilweise muss das Protein schon vor bzw. während der Tropfenentnahme ausgefallen sein, da in den kleinen wässrigen Tröpfchen unter dem

Mikroskop Partikel zu erkennen waren (s. **Abbildung 3.37**). In den TmAFP enthaltenen Tropfen wurde dagegen kein Feststoff beobachtet.

Eine Änderung der Probenpräparationsmethode, bei der die 100-200 μm großen wässrigen Tröpfchen direkt in dem Öl generiert wurden (Kapillarmethode b)), ergab im Mittel höhere TH-Werte, wenn die Messungen im jeweils ersten Messzyklus vollzogen werden konnte. Wiederholtes Einfrieren eines Tropfens, da in den vorherigen Anläufen der Kristall nicht kontrolliert werden konnte und wegschmolz, führte zur Bildung von Partikeln in dem Tropfen. Durch diese Denaturierung der Proteine entstand eine Konzentrationsvariation zwischen den einzelnen Messungen derselben Anfangskonzentration, wodurch auch die Hystereseaktivität großen Schwankungen unterlag.

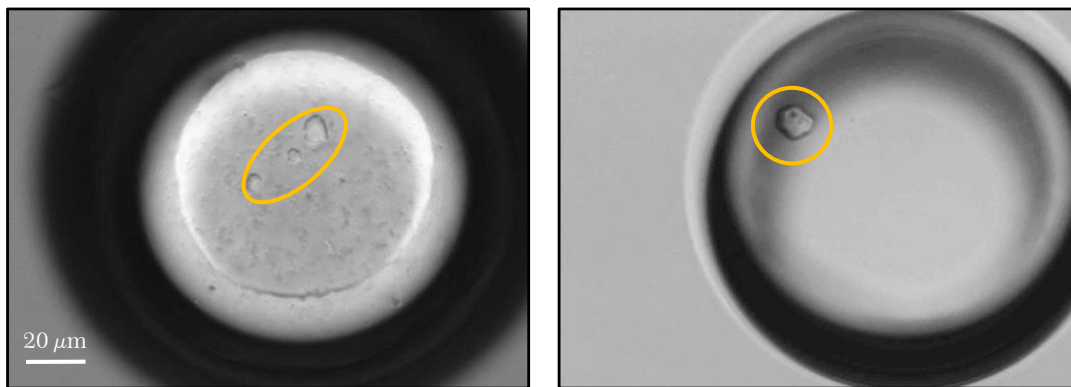


Abbildung 3.37: a) Im Tropfen mit der MBP-TmAFP-Lösung (1.6 mg ml^{-1} ; PBSx2.7) sind neben den drei Kristallen (eingekreist) zahlreiche Verunreinigungen zu erkennen, die auf denaturierte Proteine hinweisen, während b) in der TmAFP-Lösung (0.8 mg ml^{-1} ; PBSx2.7) keine Partikel zu sehen sind.

Bemerkenswert ist die Erhöhung der TH-Aktivität in der verdünnten Probe (1:1 (v:v) mit dem Puffer PBSx2.7; 0.8 mg ml^{-1} , rote Kreise; TH = $2.04 \text{ }^\circ\text{C}$) im Vergleich mit dem Protein in der PBSx1-Stammlösung (1.6 mg ml^{-1} , rote Kreise; $1.38 \text{ }^\circ\text{C}$), was auf eine Stabilisierung des Proteins durch den erhöhten Pufferanteil hindeutet (**Abbildung 3.36a**). Aus diesem Grund wurde die Stammlösung (in PBSx1) mit dem Puffer PBSx2.7 über einen 5 kDa-Filter umgepuffert, um die Pufferkonzentration zu erhöhen. Tatsächlich konnte in drei Messungen der Proteinkonzentration 1.54 mg ml^{-1} (violette Dreiecke) eine erhöhte TH-Aktivität beobachtet werden, allerdings auch hier mit einer großen Streuung zwischen den einzelnen TH-Werten von $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$. In einer vierten Messung wurde dagegen sogar eine sehr geringe Thermische Hysterese von lediglich $0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ erhalten.

Tabelle 3.10: TH-Werte für verschieden konzentrierte TmAFP- und MBP-TmAFP-Lösungen, wobei die zwei Verdünnungsstufen von TmAFP und die MBP-TmAFP-Lösungen die gleiche molare Konzentration aufweisen. Alle Messreihen wurden mit kontinuierlichem Kühlen mit -0.05 bzw. -0.1 °C min^{-1} durchgeführt. Die angegebenen Fehler entsprechen den Standardabweichungen.

TmAFP (PBSx2.7)			MBP-TmAFP (PBSx1)		
c [mg ml^{-1}]	c [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	TH [°C]	c [mg ml^{-1}]	c [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	TH [°C]
0.80	95.24	1.04 ± 0.11			
0.27	31.75	0.45 ± 0.13	1.6	32	1.38 ± 0.70
0.13	15.87	0.20 ± 0.12	0.8	16	2.04 ± 0.60

Eine 1:1 (v:v)-Verdünnung der MBP-TmAFP-Probe in PBSx2.7 mit diesem Puffer (0.77 mg ml^{-1} , violette Dreiecke; TH = 0.64 °C) führte unerwarteterweise zu einer Verschlechterung der Aktivität gegenüber der Proteinprobe in dem PBSx1-PBSx2.7-Gemisch (0.8 mg ml^{-1} ; rote Kreise; 2.04 °C; s. auch [Tabelle 3.11](#)).

Tabelle 3.11: Vergleich zwischen den TH-Werten der MBP-TmAFP-Lösungen in der PBSx1-Lösung und nach dem Umpuffern mit PBSx2.7 in Messungen mit kontinuierlichem Kühlen. Die zum Teil großen Standardabweichungen geben die große Streuung zwischen den einzelnen Messungen an.

PBSx1			PBSx2.7		
c [mg ml^{-1}]	c [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	TH [°C]	c [mg ml^{-1}]	c [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	TH [°C]
1.6	32	1.38 ± 0.70	1.54	30.70	2.80 ± 2.01
0.8	16	2.04 ± 0.86	0.77	15.35	0.64 ± 0.68

Die Messungen mit dem MBP-TmAFP sind demnach in keiner Weise reproduzierbar. Eine höhere Aktivität dieses 50-kDa-Proteins im Vergleich mit dem 8.4 kDa kleinen TmAFP kann dennoch herausgestellt werden.

3.3.2.2 Bilder der Kristallexplosion

Das Verhalten eines mit Antigefrierproteinen besetzten Eiskristalls innerhalb der Hystereselücke und am Hysteresegefrierpunkt zeigt einige Charakteristika, die sich für hyperaktive Proteine und moderate Proteine unterscheiden. Ein schmelzender Eiskristall in einer Lösung mit einem hyperaktiven Protein nimmt im Fall des TmAFP eine limonenähnliche Form an ([Abbildung 3.38](#)), die aus der Adsorption an die prismatischen und die basalen Flächen resultiert. Beim Anschmelzen schrumpft der Kristall zunächst an den prismatischen Flächen, bis auch das Eis von den basalen Flächen her schmilzt und der Kristall eine entlang der c-Achse verlängerte, abgestumpfte Form erhält. Dieses Verhalten von TmAFP wurde ebenso von (Bar-Dolev et al., 2012) beobachtet. Die beim Schmelzen erhaltene Form eines Eiskristalls bleibt innerhalb der Hystereselücke beim Abkühlen bestehen.

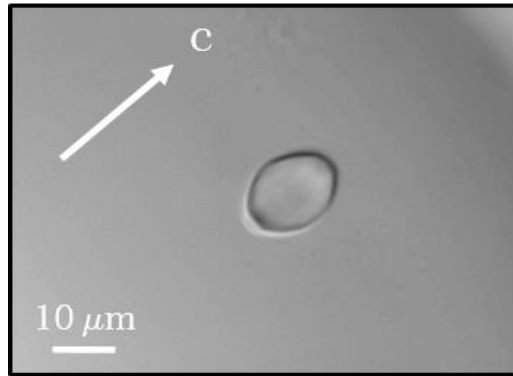


Abbildung 3.38: Eiskristall in einer TmAFP-Lösung nimmt durch Anschmelzen eine limonenartige Form an mit den spitzeren Enden in Richtung der c-Achse, da die ebenfalls besetzten basalen Flächen langsamer als die prismatischen Flächen schmelzen.

Ein interessantes Beispiel für das explosionsartige Gefrieren eines Eiskristalls innerhalb von wenigen Sekunden ist in **Abbildung 3.39** gezeigt (rot eingekreist). Der zweite, orange eingekreiste Kristall wächst dagegen nicht, da dessen Hysteresetemperatur niedriger liegt. Das Gefrieren findet weder aus den basalen noch aus den prismatischen Flächen des Kristalls statt, sondern das Eis bricht an den jeweils sechs Kanten zwischen den beiden basalen und den prismatischen Flächen in Richtung der a-Achsen aus, die die Schwachstellen des Eiskristalles darstellen.

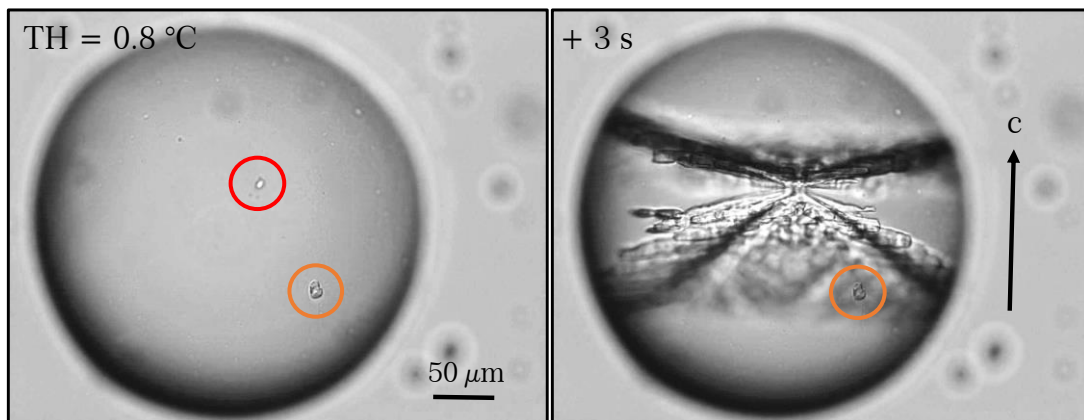


Abbildung 3.39: Ein Eiskristall (rot umrandet) in einer TmAFP-Lösung (0.8 mg ml^{-1} ; $95 \mu\text{M}$) mit einer Hysterese von 0.8°C wächst beim Erreichen der Hysteresegefrieretemperatur schlagartig, wie das weit fortgeschrittene Wachstum innerhalb von 3 s zeigt. Ein weiterer Kristall (orange umrandet) bleibt in seiner ursprünglichen Größe, da dessen TH-Punkt noch nicht erreicht ist. Das Wachstum des Eises findet entlang der Schwachstellen an den Kanten zwischen den basalen und den prismatischen Flächen statt. Ober- und unterhalb des Kristalls aus den basalen Flächen und an den Seitenflächen (prismatische Flächen) ist dagegen kein Wachstum zu beobachten.

Auch die mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (FASTCAM Mini Ax100, Photron) aufgenommenen Bilder (**Abbildung 3.40**) deuten auf ein zweischichtiges Wachstum hin, wie es auch in der Literatur (Bar et al., 2008; Bar-Dolev et al., 2012) dokumentiert ist. Diese Bilder zeigen zudem besonders deutlich, dass an der basalen Fläche kein Eiswachstum stattfindet.

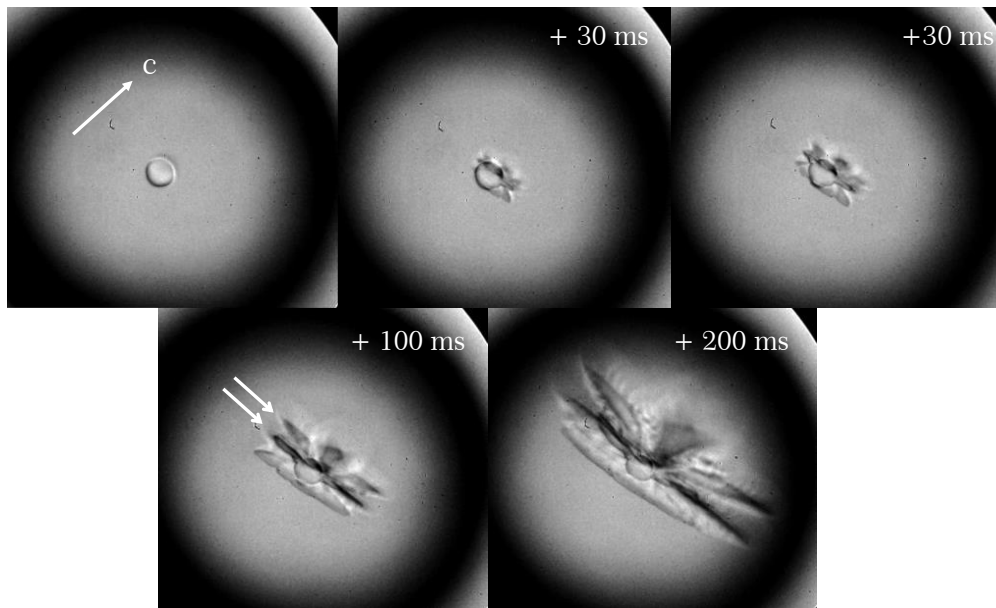


Abbildung 3.40: Aus der Aufnahme mit der Hochgeschwindigkeitskamera extrahierte Bilder zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigen hochaufgelöst das Wachstum des Eiskristalls in sechs Richtungen entlang der a-Achsen bei einer TmAFP-Konzentration von 0.8 mg ml^{-1} und einer TH von $0.9 \text{ }^\circ\text{C}$. Deutlich erkennbar ist das nicht vorhandene Wachstum aus der basalen Fläche heraus, an die die Proteine ebenfalls adsorbieren. Das zweischichtige Wachstum aus den Kanten zwischen den basalen und prismatischen Flächen ist zu erahnen (Bild unten links). Die beiden mit Pfeilen markierten, aus der Bildebene herauswachsenden Schichten liegen parallel übereinander und brechen auf der Höhe der beiden basalen Flächen aus.

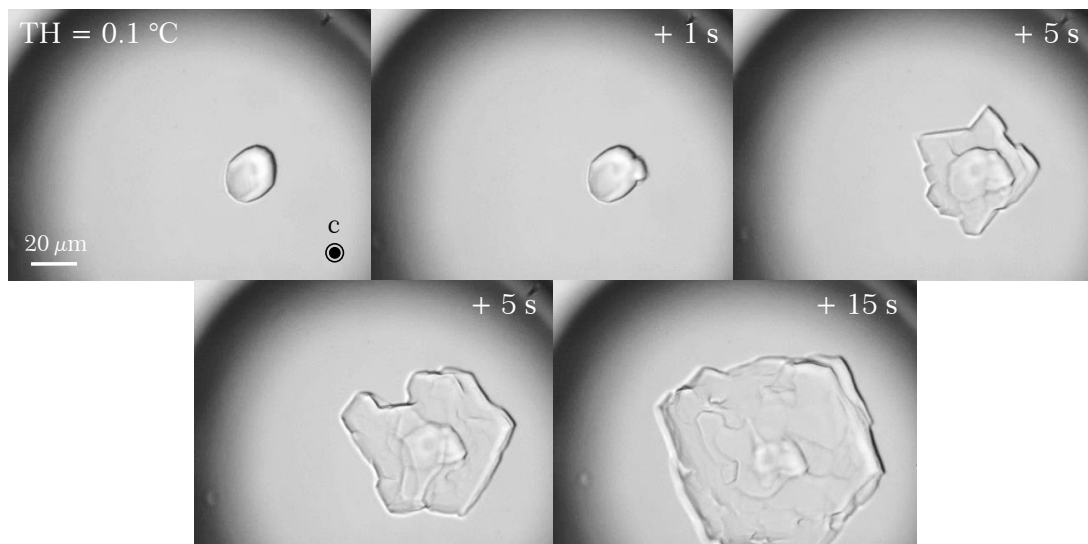


Abbildung 3.41: Bei einer geringeren Konzentration von 0.13 mg ml^{-1} TmAFP ($16 \text{ } \mu\text{M}$) und einer entsprechend kleinen Hysterese von $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ wächst der Eiskristall beim kontinuierlichen Kühlen mit $-0.1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ recht langsam, wie die 26 s umfassende Bildsequenz zeigt. Das Wachstum findet schichtartig in Richtung der a-Achsen statt.

Der Vergleich der TH-Messungen bei hoher TmAFP-Konzentration (0.8 mg ml^{-1} bzw. $95 \text{ } \mu\text{M}$) mit der bei moderater Konzentration von 0.13 mg ml^{-1} (bzw. $16 \text{ } \mu\text{M}$) zeigt eine Korrelation zwischen der Hystereseaktivität und der Wachstumsgeschwindigkeit. Hat sich bei einer Hysterese von $0.8 \text{ }^\circ\text{C}$ der Kristall nach 3 s über das gesamte Ausmaß des Tropfens ($d = 250 \text{ } \mu\text{m}$) erstreckt (**Abbildung 3.39**) und ist bei einer Hysterese von $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$

nach spätestens 1 s der gesamte Tropfen durchgefroren (Daten nicht gezeigt), wächst der Kristall ($\sim 20 \mu\text{m}$) bei einer Hysterese von $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ innerhalb von 26 s auf die zehnfache Fläche an (s. **Abbildung 3.41**) Zudem verläuft das Wachstum stufenweise in Richtung der a-Achse.

Ein gegensätzliches Verhalten zeigt ein Eiskristall innerhalb der Hystereselücke in Anwesenheit eines moderaten Antigefrierproteins. Im Gegensatz zu hyperaktiven Proteinen, die dem Eiskristall beim Schmelzen eine typische Form geben, bildet diese sich bei moderaten Proteinen innerhalb der Hystereselücke beim Abkühlen aus (s. **Abbildung 3.42**). Am Beispiel von AFGP 8 (aus *Dissostichus mawsoni*; antaktischer Seehecht; Aufreinigung: AG A. deVries, Universität Illinois, USA) ist das schrittweise Wachstum des anfänglich nahezu runden Eiskristalls (links oben) in die charakteristische hexagonale Bipyramide zu beobachten, deren Breite näherungsweise unverändert bleibt. Der Eiskristall wächst mit zunehmender Zeit in die Länge entlang der c-Achse, weil somit die nicht adsorbierte basale Fläche abgeschirmt wird (Bar-Dolev et al., 2012). Am Hysteresegefrierpunkt kann das Wachstum aus der basalen Fläche nicht mehr durch die Adsorption an die pyramidalen Flächen aufgehoben werden und der Eiskristall bricht an den Spitzen der Bipyramide aus (rechts unten). Aufgrund der gering ausgeprägten Hysterese und des generell langsameren Wachstums des Eises aus der basalen Fläche heraus ist die Wachstumsgeschwindigkeit sehr langsam.

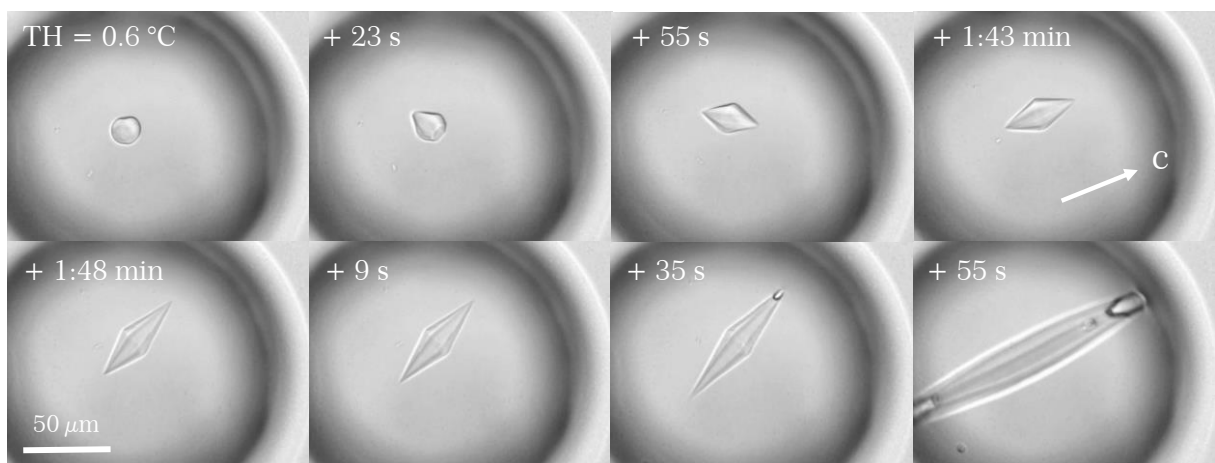


Abbildung 3.42: Bildsequenz aus einer TH-Messung mit dem moderaten AFGP 8, das bei einer Konzentration von 10 mg ml^{-1} (3.85 mM in $\text{PBS} \times 2.7$) eine Hystereseaktivität von $0.6 \text{ }^\circ\text{C}$ aufweist. Anders als bei dem hyperaktiven TmAFP bildet sich eine spezifische Eiskristallform nicht beim Schmelzen (Bild oben links), sondern beim Abkühlen aus. Da AFGP 8 nicht an die basalen Flächen adsorbieren kann, werden diese durch Adsorption an die pyramidalen Flächen minimiert, sodass sich eine Bipyramide ausbildet. Bei kontinuierlichem Abkühlen ($-0.1 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$) wird die Bipyramide zunächst entlang ihrer Spitzen größer, bis der Kristall parallel zur c-Achse aus der basalen Fläche ausbricht (unten rechts).

Beim Vergleich der TH-Aktivitäten des hyperaktiven TmAFP von $1 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einer Konzentration von $\sim 100 \mu\text{M}$ und der des moderaten AFGP 8 mit $0.6 \text{ }^\circ\text{C}$ bei einer mehr als zehnfachen Konzentration (3.85 mM) wird der Unterschied zwischen den beiden Klassen von Antigefrierproteinen deutlich.

3.3.3. Untersuchungen zur Eisnukleationsaktivität von TmAFP

Das Antigefrierprotein aus *Tenebrio molitor* zählt zu den hyperaktiven AFPs, da es bei einer Konzentration von etwa $100 \mu\text{M}$ hohe Thermische Hystereseaktivitäten über $1 \text{ }^\circ\text{C}$ aufweist. Auch die hohe IRI-Aktivität mit c_1 um $1 \mu\text{M}$ zeigt die gute eisbindende Eigenschaft des TmAFP an, welche auf eine hohe Übereinstimmung der Kristallstruktur des Proteins mit dem Kristallgitter von Eis (Liou et al., 2000) bzw. auf die eisähnliche Ordnung der Wassermoleküle in dessen Hydrathülle an der eisbindenden Stelle (Hudait et al., 2018b) zurückzuführen ist. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Protein auch in der Lage ist, an dieser eisbindenden Stelle Wassermoleküle zu einem eisähnlichen Gefüge anzuordnen, das bei Erreichen einer kritischen Größe makroskopisches Eiswachstum auslöst, d.h. dass das TmAFP als heterogener Eiskeim fungieren kann. Aufgrund der geringen Größe von 8.4 kDa würde nach der klassischen Nukleationstheorie (2.4) eine sehr niedrige Nukleationstemperatur von $< -30 \text{ }^\circ\text{C}$ knapp oberhalb der homogenen Nukleationstemperatur erwartet werden, sodass sich die in dieser Arbeit für Nukleationsexperimente angewandte BINARY-Methode mit einer Hintergrundnukleation von Wasser bei $T_{50} \sim -30 \text{ }^\circ\text{C}$ nicht zur Erfassung einer möglichen heterogenen Nukleationsaktivität des TmAFP eignen würde. Aus diesem Grund wurde mit der Unterstützung von L. Eickhoff auf die von ihm aufgebaute Mikrofluidikapparatur (Eickhoff, 2017) zurückgegriffen, mit der aufgrund der kleineren Tropfengröße von $100 \mu\text{m}$ heterogene Nukleation oberhalb von $-36 \text{ }^\circ\text{C}$ erfasst werden kann.

In einer Mikrofluidik-Messung mit TmAFP enthaltenen wässrigen Tropfen (0.8 mg ml^{-1} bzw. $95 \mu\text{M}$ in PBSx2.7) zeigt sich tatsächlich eine schwache heterogene Nukleationsaktivität dieses Antigefrierproteins (**Abbildung 3.43**).

Durch Gefrierpunktserniedrigung verschiebt sich die kumulative Eiskurve f_{Eis} des Puffers (grau) relativ zur Wasserkurve (blau), die abgesehen von den wenigen Nukleationsereignissen oberhalb von $-36 \text{ }^\circ\text{C}$ durch homogene Nukleation zwischen -36 und $-37 \text{ }^\circ\text{C}$ verursacht wird, um etwa $3 \text{ }^\circ\text{C}$ zu tieferen Temperaturen ($T_{50} \sim -39 \text{ }^\circ\text{C}$; s. **Tabelle 3.12**). Die f_{Eis} -Kurve des TmAFP (schwarz) verschiebt sich dagegen trotz der durch den Puffer vorhandenen Gefrierpunktserniedrigung relativ zu der Wasserkurve um etwa $2 \text{ }^\circ\text{C}$ zu höheren Temperaturen ($T_{50} \sim -34 \text{ }^\circ\text{C}$). Wird die Gefrierpunktserniedrigung des Puffers mit $(2.7 \pm 0.3) \text{ }^\circ\text{C}$ geschätzt, ergibt sich somit für das TmAFP eine Median-Nukleationstemperatur $T_{50,\text{korr}}$ von etwa $(-31.3 \pm 0.3) \text{ }^\circ\text{C}$. Der gesamte Nukleationsbereich erstreckt sich dabei über einen breiteren Temperaturbereich von $-31 \text{ }^\circ\text{C}$ ($f_{\text{Eis}} = 0.1$) bis zu $-36 \text{ }^\circ\text{C}$ ($f_{\text{Eis}} = 0.9$ und Einsetzen der homogenen Nukleation).

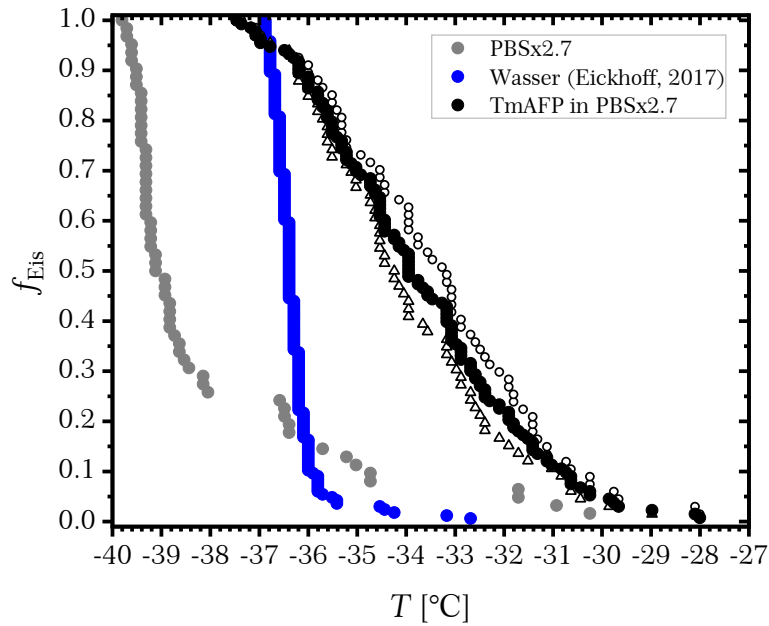


Abbildung 3.43: Nukleationsmessungen an 100 µm großen Tropfen in der Mikrofluidik von wässrigen Lösungen mit TmAFP (in PBSx2.7; schwarz), dem Pufferpuffer PBSx2.7 (grau) und reinem Wasser (blau). Die offenen Symbole stellen die beiden Einzelmessungen mit TmAFP dar, die zu einer gesamten Kurve (gefüllte Symbole) kombiniert wurden. Kühlrate: -1 °C min^{-1} .

Tabelle 3.12: Kalibrierte Median-Nukleationstemperaturen T_{50} der drei Messreihen mit Wasser, TmAFP (0.8 mg ml^{-1} ; 95 µM) und dem Puffer PBSx2.7 bei einer Kühlrate von -1 °C min^{-1} . Die beiden in Klammern angegebenen Werte für TmAFP entsprechen den T_{50} Werten der beiden Einzelmessungen, der Wert von -34.0 °C entspricht dem Median der Kombination der beiden Messungen. Zu beachten ist die Gefrierpunktserniedrigung in der Pufferlösung, die auf $(2.7 \pm 0.3)\text{ °C}$ geschätzt wird und eine korrigierte Nukleationstemperatur $T_{50,\text{korr}}$ in der TmAFP-Lösung ergibt.

Probe	$T_{50}\text{ [°C]}$	$T_{50,\text{korr}}\text{ [°C]}$
Wasser	-36.4	
PBSx2.7	-39.1	
TmAFP	-34.0	-31.3
(in PBSx2.7)	(-34.2/-33.2)	(-31.5/-30.7)

Der Puffer scheint einige Verunreinigungen zu enthalten, worauf die Nukleationsereignisse bei Temperaturen oberhalb von -38.5 °C hindeuten. Diese Partikel könnten bei der Präparation der Pufferlösung eingetragen worden sein, da die Lösung nicht mit reinem bidestilliertem Wasser angesetzt wurde. Alterungsprozesse der vorhandenen Verunreinigungen können dann durch die unbedachte Lagerung im Kühlschrank anstatt im Gefrierschrank beschleunigt worden sein. Da die TmAFP-Lösung dauerhaft im Gefrierschrank gelagert wurde, kann ein Einfluss des Mediums auf deren Nukleationsaktivität ausgeschlossen werden. Die Reproduzierbarkeit der TmAFP-Messung, wie sie hier gezeigt ist, und hier nicht dargestellte Verdünnungsexperimente (Eickhoff et al., 2018) weisen eindeutig darauf hin, dass die Nukleation von dem TmAFP ausgelöst worden sein muss.

Zu erwähnen sei die geringere Monodispersität der Tropfen in den beiden TmAFP-Experimenten als in Mikrofluidik-Messungen üblich ist, wie in **Abbildung 3.44** an Beispielbildern aus den Messungen gezeigt ist. Die Nukleationsstatistik kann leicht verfälscht werden durch kleinere, bei niedrigeren Temperaturen nukleierende Tropfen bzw. durch sich berührende Tropfen. Wurde ein Tropfen durch einen benachbarten Tropfen angeimpft, wurden diese Tropfen in der Auswertung als ein Tropfen mit der Nukleationstemperatur des zuerst gefrorenen Tropfens gewertet. Aufgrund der fehlerhaften Erkennung der Nukleationsereignisse durch das Programm wurden sämtliche Nukleationstemperaturen der drei Messungen in dieser Arbeit manuell ermittelt. Neuere Messungen von L. Eickhoff (Eickhoff et al., 2018) mit hoher Monodispersität der Proben tropfen ergaben vergleichbare Messwerte, sodass die hier dargestellten Daten aussagekräftig sind.

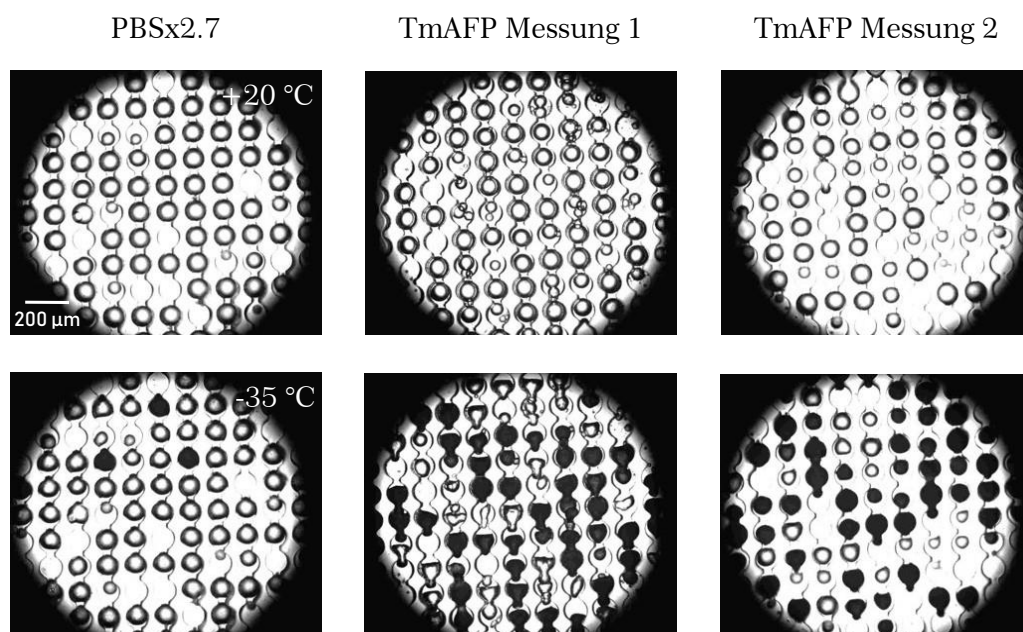


Abbildung 3.44: Bildausschnitte aus den Mikrofluidik-Nukleationsmessungen mit PBSx2.7 (links) und den beiden TmAFP-Messungen (Mitte und rechts) zu Beginn der Messung bei Raumtemperatur (obere Reihe) und bei -35 °C (untere Reihe) mit teilweise gefrorenen Tropfen. Während die Tropfen der PBS-Messung eine hohe Monodispersität aufweisen, ist diese besonders in der TmAFP-Messung 1 (Mitte) nicht gegeben.

Nach der Klassischen Nukleationstheorie (**Gleichung (2.4)**) würde für einen kritischen Eiscluster mit einem Radius, der einem Molekulargewicht des Eiskristalls von 8.4 kDa entspricht, eine Nukleationstemperatur von -32.5 °C erwartet werden (s. auch **Kapitel 3.4**). Dieser vorhergesagte Wert stimmt unter Berücksichtigung der Abschätzung einer ungefähren Gefrierpunktserniedrigung sehr gut mit dem in dieser Arbeit erhaltenen Wert von $(-31.3 \pm 0.3)\text{ °C}$ überein (Mittelwert der kombinierten Daten: $(-31.0 \pm 2.1)\text{ °C}$; Mittelwert der Mediane der Einzelmessungen: $(-31.0 \pm 0.5)\text{ °C}$). Eine vergleichbare Beobachtung wurde am Beispiel eines AFP III mit einer heterogenen Nukleationstemperatur von etwa -33 °C gemacht, die der aus der CNT vorhergesagten Temperatur für ein 8.1 kDa-Protein von $(-33 \pm 3)\text{ °C}$ ebenfalls sehr nahe kommt (Eickhoff et al., 2018).

3.3.4. Zusammenfassung TmAFP

Die Rekristallisationsexperimente an dem Antifrierprotein aus der Mehlkäferlarve des *Tenebrio molitor* (TmAFP) ergaben eine mit dem AFP III vergleichbare IRI-Aktivität mit einer effektiven Konzentration $c_i = 1.6 \mu\text{M}$, die allerdings etwas höher liegt als die der sehr effektiven AFGPs. Sowohl in diesen IRI-Messungen als auch in den TH-Messungen, die in dieser Arbeit erstmalig in der Arbeitsgruppe mithilfe einer mikroskopischen Methode durchgeführt wurden, ist am Beispiel von TmAFP (8.4 kDa) und dem 50 kDa großen Fusionsprotein MBP-TmAFP eine Abhängigkeit der IRI- und TH-Aktivität von der Größe des Proteins bei gleicher eisbindender Stelle belegt worden. Aufgrund des größeren Rückgrats weist MBP-TmAFP auf molarer Ebene sowohl eine höhere rekristallisationsinhibierende Wirkung ($0.5 \mu\text{M}$) als auch eine höhere Thermische Hystereseaktivität auf als das TmAFP. Bei einer molaren Konzentration von etwa $32 \mu\text{M}$ wurde für das TmAFP eine TH-Aktivität von $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen, während MBP-TmAFP Hysteresen von $2.5 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zu $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ermöglicht. Instabilitäten von MBP-TmAFP in der Emulsionsprobe erschwerten allerdings die Reproduzierbarkeit der TH-Messungen.

Beim Vergleich der Hysteresewerte mit in der Literatur angeführten Werten müssen die Messbedingungen berücksichtigt werden, da die TH-Aktivität von Parametern wie Kühlrate, Kristallgröße und vor allem Messzeit beeinflusst wird. In dieser Arbeit konnte die Abhängigkeit von der Messzeit, die in der langsamen Akkumulation des hyperaktiven Proteins an den basalen Flächen begründet liegt, bestätigt werden. Die Hystereseaktivität des TmAFP bei einer Konzentration von $95 \mu\text{M}$ konnte durch Variation der Messzeiten von 1°C auf $1.5 \text{ }^\circ\text{C}$ und in einer Messung sogar bis zu $3.7 \text{ }^\circ\text{C}$ angehoben werden. Desweiteren konnte eine Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit am Hysteresegefrierpunkt von dem Ausmaß der Hysterese und dem hyperaktiven oder moderaten Charakter des Antifrier(glyko)proteins gezeigt werden. In einer Aufnahme mit einer Hochgeschwindigkeitskamera konnte das Ausbrechen des Eises an den Kanten zwischen basalen und prismatischen Flächen bei Adsorption des Eiskristalls durch das hyperaktive TmAFP verdeutlicht werden.

Die Antifrieraktivität von dem hyperaktiven TmAFP ist in der Literatur bezüglich der Hystereseigenschaften häufig beschrieben worden. Die Fragestellung, ob ein Molekül mit Antifriereigenschaften auch eisnukleierende Wirkung besitzt, hat in den letzten Jahren vor allem durch Modellierungen Auftrieb bekommen. In dieser Arbeit und in darauf aufbauenden erweiterten Messungen von Eickhoff et al. (2018) konnte erstmals eine heterogene Nukleationsaktivität und damit eine duale Funktion von TmAFP nachgewiesen werden. Die Eisnukleationstemperatur einer $95 \mu\text{M}$ wässrigen Lösung liegt entsprechend der geringen Größe von 8.4 kDa nahe bei der homogenen Nukleationsgrenze bei etwa $-31 \text{ }^\circ\text{C}$.

Die biologische Funktion liegt aufgrund der sehr geringen Nukleationsaktivität weniger in einem kontrollierten Gefrierprozess, sondern in der Eigenschaft als hyperaktives Antigefrierprotein mit hoher Thermischer Hysterese- und Eisrekristallisationsinhibierungsaktivität in gefriervermeidenden Organismen.

Am Beispiel des TmAFP konnte gezeigt werden, dass Moleküle mit Antigefriereeigenschaften eine duale Funktion aufweisen und somit auch Eisnukleation auslösen können. Diese Eigenschaft ist für weitere Moleküle gezeigt worden, deren Untersuchung in dieser Arbeit begleitet wurde. Einerseits konnte für den roten Farbstoff Safranin T, dessen Antigefriereeigenschaften von Drori et al. (2016) beschrieben und mit Komplexbildung erklärt worden waren, eine Nukleationsaktivität von -27 °C für eine Konzentration von 10 mg ml^{-1} nachgewiesen werden (Sabadasch, 2017). L. Eickhoff konnte zudem für das anorganische Salz Zirkoniumacetat die Eigenschaft als heterogener Eisnukleator in umfangreichen Messungen präsentieren (Eickhoff, 2017), nachdem Deville et al. (2011) und Mizrahy et al. (2013) dessen ebenfalls aus Komplexbildung resultierende eisadsorbierende Eigenschaft aufgezeigt hatten. Ebenfalls wurde eine Erhöhung der Onsettemperatur des Nukleationssignals einer wässrigen PVA-Lösung im Vergleich mit reinem Wasser (Dreischmeier, 2009; Ogawa et al., 2009; Wolf, 2018; Weng et al., 2018) beobachtet, deren Antigefrieraktivität schon länger bekannt ist (Budke, C. and Koop, T., 2006).

3.4. Zusammenhang zwischen Molekülgröße und Eisnukleations- oder Antigefrieraktivität

Der kritische Radius r_{krit} eines Eisclusters lässt sich für verschiedene Temperaturen mit der **Gleichung (2.4)** über die in Zobrist et al. (2007) angegebenen Parametrisierungen für $\sigma_{\text{sl}}(T)$ und $v_{\text{Eis}}(T)$ sowie $S(T)$ (vgl. **Gleichungen (2.2) und (2.27)**) berechnen. Das temperaturabhängige molekulare Volumen von Eis wird ebenso zur Berechnung des Molekulargewichts dieses kritischen Eisembryos verwendet. Zeigt sich eine Übereinstimmung der Nukleationstemperatur von einem Eiskeim eines bestimmten Molekulargewichts mit der aus der Klassischen Nukleationstheorie vorhergesagten Temperaturabhängigkeit des entsprechenden kritischen Radius, wie sie in **Abbildung 3.45** für die drei in dieser Arbeit untersuchten heterogenen Eisnukleatoren dargestellt ist, wird die Bedeutsamkeit der Größe des Moleküls für die Nukleationsaktivität hervorgehoben.

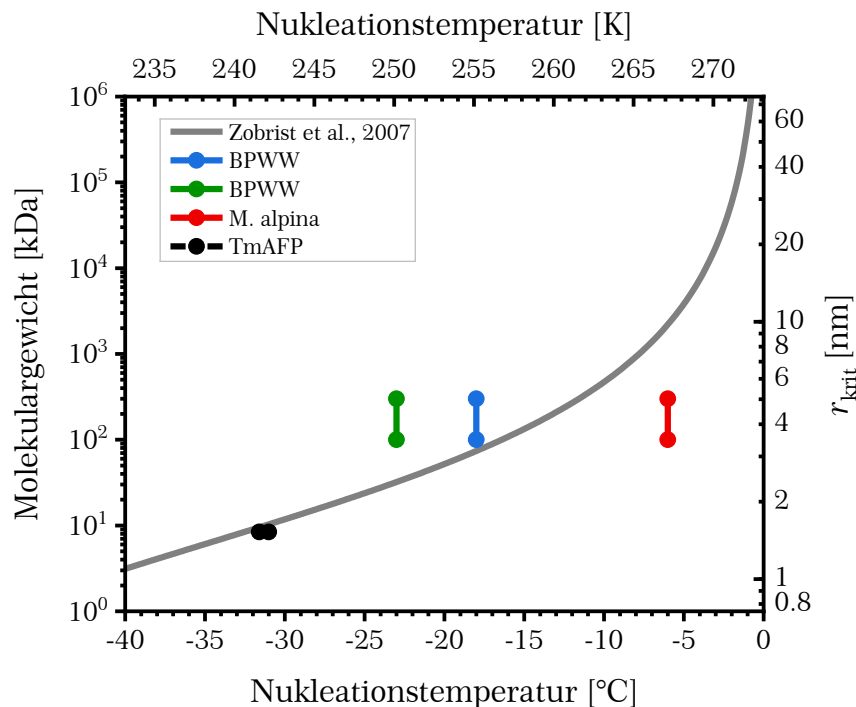


Abbildung 3.45: Die für die drei in dieser Arbeit vermessenen Eiskeime bestimmten Nukleationstemperaturen lassen sich mit der aus der Klassischen Nukleationstheorie erhaltenen Abhängigkeit des mit dem kritischen Radius r_{krit} korrelierenden Molekulargewichts eines Eisembryos von der Temperatur beschreiben. Die graue Kurve wurde über die in Zobrist et al. (2007) angegebenen Parametrisierungen berechnet. Da das Molekulargewicht der Eiskeime in dem Birkenpollenwaschwasser (BPWW; blau und grün) und *M. alpina* (rot) nicht genau bestimmt ist, wurden die bekannten oberen und unteren Grenzen eingetragen. Der Bereich der Nukleationstemperaturen von TmAFP (schwarz) berücksichtigt sowohl die Gefrierpunktserniedrigung als auch Messungenauigkeiten.

Mögliche Abweichungen von der theoretischen Kurve können von einem in der klassischen Nukleationstheorie nicht berücksichtigten Beitrag der Bindungsaffinität zwischen dem Molekül und dem Eisembryo resultieren. Weitere Faktoren, die die gemessene Nukleationstemperatur beeinflussen, können Messbedingungen wie die Kühlrate oder die Konzentration des Eiskeims sein. Ist die Größe der eisnukleierenden Stelle kleiner als die des gesamten Moleküls, würde zudem die vorhergesagte Nukleationsaktivität überschätzt werden. Je größer das eisnukleierende Molekül ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass die tatsächliche eisbindende Stelle des Moleküls nur einen kleinen Beitrag zu der Gesamtgröße stellt. Mögliche Ungenauigkeiten des Molekulargewichtes, wie es bei den Eisnukleatoren im BPWW oder aus *M. alpina* der Fall ist, können ebenfalls Abweichungen von der Theorie erklären. Diese Ungenauigkeiten resultieren dabei auch daraus, dass die Molmasseneinteilung über Zentrifugenfilter erfolgte, deren Funktion mehr in der Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe liegt als in einer Analyse der Molekülgröße.

Für zahlreiche weitere Eisnukleatoren konnte eine mehr oder weniger gute Vorhersage der heterogenen Eisnukleationstemperatur alleine aus der Molekülgröße getroffen werden (Eickhoff et al., 2018). Für ein AFP vom Typ III mit einer Molmasse von 8.1 kDa wurde eine Nukleationstemperatur von etwa -33 °C ($66\text{ }\mu\text{M}$) erhalten, was ebenso sehr gut mit der Theorie (-33 °C) übereinstimmt.

Es zeigt sich, dass die Größe eines Moleküls mit eisbindender Stelle dessen vorrangige Funktion in seinem Organismus bestimmt: Große Moleküle wie die Eiskeime aus den Birkenpollen oder *M. alpina* mit einem Molekulargewicht $> 100\text{ kDa}$ zeigen eine hohe Eisnukleationsaktivität mit $T_{\text{het}} > -23\text{ °C}$. Aufgrund ihrer geringen Konzentration im Organismus ist eine Antifrieraktivität dieser Eisnukleatoren nicht bedeutend. Dagegen treten die kleineren Moleküle, die bei niedrigen Temperaturen an der homogenen Nukleationsgrenze ($\sim -37\text{ °C}$) das Gefrieren auslösen, bei moderaten Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes als TH- oder IRI-aktive Substanzen hervor. Sowohl das hyperaktive Antifrierprotein aus *T. molitor* mit einer Masse von 8.4 kDa als auch die eisstrukturierenden Moleküle aus den Birkenpollen sowie *M. alpina* mit einer Molekularmasse kleiner als 100 kDa bekräftigen diese Aussage.

Da in DSC-Messungen der Proben, die die eisstrukturierenden Moleküle der Pollen und der Pilzsporen enthielten, keine Eisnukleationsaktivität oberhalb der homogenen Nukleationstemperatur von -37 °C detektiert werden konnte, könnte eine maximale Größe dieser Moleküle von etwa 5 kDa vermutet werden. Deren Nukleationstemperatur würde gemäß der CNT unterhalb von -37 °C liegen und demnach nicht mehr erfasst werden können.

Literaturverzeichnis

- Adar, C., Sirotinskaya, V., Bar Dolev, M., Friehmann, T., and Braslavsky, I.: Falling water ice affinity purification of ice-binding proteins, *Sci. Rep.*, 8, 2018.
- Aerosol Inorganics Model: <http://www.aim.env.uea.ac.uk/aim/aim.php>, zuletzt aufgerufen am: 2014.
- Angell, C. A.: Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions, *Chem. Rev.*, 102, 2627–2650, 2002.
- Atkins, P. W. and Paula, J. de: *Physikalische Chemie*, 4., vollst. überarb. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim, 1188 S., 2006.
- Augustin, S., Wex, H., Niedermeier, D., Pummer, B., Grothe, H., Hartmann, S., Tomsche, L., Clauss, T., Voigtlaender, J., Ignatius, K., and Stratmann, F.: Immersion freezing of birch pollen washing water, *Atmos. Chem. Phys.*, 13, 10989–11003, 2013.
- Augustin-Bauditz, S., Wex, H., Denjean, C., Hartmann, S., Schneider, J., Schmidt, S., Ebert, M., and Stratmann, F.: Laboratory-generated mixtures of mineral dust particles with biological substances: Characterization of the particle mixing state and immersion freezing behavior, *Atmos. Chem. Phys.*, 16, 5531–5543, 2016.
- Baker, M. B.: Cloud microphysics and climate, *Science*, 276, 1072–1078, 1997.
- Bar, M., Celik, Y., Fass, D., and Braslavsky, I.: Interactions of β -helical antifreeze protein mutants with ice, *Crystal Growth & Design*, 8, 2954–2963, 2008.
- Bar Dolev, M., Bernheim, R., Guo, S., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Putting life on ice: Bacteria that bind to frozen water, *J. R. Soc. Interface*, 13, 1–11, 2016a.
- Bar Dolev, M., Braslavsky, I., and Davies, P. L.: Ice-binding proteins and their function, *Annu. Rev. Biochem.*, 85, 515–542, 2016b.
- Bar-Dolev, M., Celik, Y., Wettlaufer, J. S., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: New insights into ice growth and melting modifications by antifreeze proteins, *J. R. Soc. Interface*, 9, 3249–3259, 2012.
- Barth, A. and Zscherp, C.: What vibrations tell about proteins, *Quart. Rev. Biophys.*, 35, 369–430, 2002.
- Basu, K., Graham, L. A., Campbell, R. L., and Davies, P. L.: Flies expand the repertoire of protein structures that bind ice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1–6, 2015.
- Bäumer, A., Duman, J. G., and Havenith, M.: Ice nucleation of an insect lipoprotein ice nucleator (LPIN) correlates with retardation of the hydrogen bond dynamics at the myo-inositol ring, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 19318–19323, 2016.
- Bigg, E. K.: The supercooling of water, *Proc. Phys. Soc. B*, 66, 688–694, 1953.

- Bio-Rad: Unstained Protein Ladders: <http://www.bio-rad.com/de-de/category/protein-ladders-standards-markers?ID=09507551-2848-4bd1-a3c1-650b4d41aa48>, zuletzt aufgerufen am: 02.07.2018.
- Böttcher, M.: Untersuchungen der heterogenen Eisnukleation in Schwefelsäure- und Ammoniumnitrat-Lösungen, Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2009.
- Bouvet, V. R., Lorello, G. R., and Ben, R. N.: Aggregation of antifreeze glycoprotein fraction 8 and its effect on antifreeze activity, *Biomacromolecules*, 7, 565–571, 2006.
- Braslavsky, I.: Ansatz PBS-Puffer, E-Mail, 2018.
- Braslavsky, I. and Drori, R.: LabVIEW-operated Novel Nanoliter Osmometer for Ice Binding Protein Investigations, *jove*, 1–6, 2013.
- Bredow, M., Tomalty, H. E., Smith, L., and Walker, V. K.: Ice and anti-nucleating activities of an ice-binding protein from the annual grass, *Brachypodium distachyon*, *Plant, cell & environment*, 41, 983–992, 2018.
- Bredow, M. and Walker, V. K.: Ice-Binding Proteins in Plants, *Frontiers in Plant Sciences*, 8, 2017.
- Broadley, S. L., Murray, B. J., Herbert, R. J., Atkinson, J. D., Dobbie, S., Malkin, T. L., Condliffe, E., and Neve, L.: Immersion mode heterogeneous ice nucleation by an illite rich powder representative of atmospheric mineral dust, *Atmos. Chem. Phys.*, 12, 287–307, 2012.
- Brotzakis, Z. F., Voets, I. K., Bakker, H. J., and Bolhuis, P. G.: Water structure and dynamics in the hydration layer of a type III anti-freeze protein, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 20, 6996–7006, 2018.
- Budke, C.: Kryomikroskopische Untersuchungen zur Nukleation und Rekristallisation von Eis, Diplomarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2005.
- Budke, C.: Hemmung der Eisrekristallisation in wässrigen Lösungen durch Antifrierglykopeptide, Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld, 170 S., 2010.
- Budke, C.: LabView-Auswertung IRRINA, schriftliche Mitteilung, 2018.
- Budke, C., Dreyer, A., Jaeger, J., Gimpel, K., Berkemeier, T., Bonin, A. S., Nagel, L., Plattner, C., DeVries, A. L., Sewald, N., and Koop, T.: Quantitative Efficacy Classification of Ice Recrystallization Inhibition Agents, *Crystal Growth & Design*, 14, 4285–4294, 2014.
- Budke, C., Heggemann, C., Koch, M., Sewald, N., and Koop, T.: Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory, *J. Phys. Chem. B*, 113, 2865–2873, 2009.
- Budke, C. and Koop, T.: Ice recrystallization inhibition and molecular recognition of ice faces by poly(vinyl alcohol), *Chem. Phys. Chem.*, 7, 2601–2606, 2006.

- Budke, C. and Koop, T.: BINARY: an optical freezing array for assessing temperature and time dependence of heterogeneous ice nucleation, *Atmos. Meas. Tech.*, 8, 689–703, 2015.
- Cantrell, W. and Heymsfield, A.: Production of ice in tropospheric clouds: a review, *Bull. Amer. Meteor. Soc.*, 86, 795–807, 2005.
- Celik, Y., Drori, R., Pertaya-Braun, N., Altan, A., Barton, T., Bar-Dolev, M., Groisman, A., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Microfluidic experiments reveal that antifreeze proteins bound to ice crystals suffice to prevent their growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 1309–1314, 2013.
- Celik, Y., Graham, L. A., Mok, Y.-F., Bar, M., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Superheating of ice crystals in antifreeze protein solutions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5423–5428, 2010.
- Charpentier, T. V. J., Neville, A., Millner, P., Hewson, R., and Morina, A.: An Investigation of Freezing of Supercooled Water on Anti-Freeze Protein Modified Surfaces, *J. Bionic Engin.*, 10, 139–147, 2013.
- Cheng, A. and Merz, K. M.: Ice-binding mechanism of winter flounder antifreeze proteins, *Biophys. J.*, 73, 2851–2873, 1997.
- Choi, Y. E.: A Study on the Hyperactive Antifreeze Proteins from the Insect *Tenebrio molitor*, Masterarbeit, Ohio University, Ohio, 51 S., 2007.
- Christner, B. C., Morris, C. E., Foreman, C. M., Cai, R., and Sands, D. C.: Ubiquity of biological ice nucleators in snowfall, *Science*, 319, 1214, 2008.
- Conen, F., Morris, C. E., Leifeld, J., Yakutin, M. V., and Alewell, C.: Biological residues define the ice nucleation properties of soil dust, *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 9643–9648, 2011.
- Daley, M. E., Spyropoulos, L., Jia, Z., Davies, P. L., and Sykes, B. D.: Structure and Dynamics of a β -Helical Antifreeze Protein, *Biochemistry*, 41, 5515–5525, 2002.
- Daley, M. E. and Sykes, B. D.: Characterization of threonine side chain dynamics in an antifreeze protein using natural abundance ^{13}C NMR spectroscopy, *Journal of biomolecular NMR*, 29, 139–150, 2004.
- Davies, P. L.: Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth, *Trends Biochem. Sci.*, 39, 548–555, 2014.
- Davies, P. L.: Anwendbarkeit der Ice Shell Purification, mündliche Mitteilung an T. Koop, 2017.
- DeMott, P. J. and Prenni, A. J.: New Directions: Need for defining the numbers and sources of biological aerosols acting as ice nuclei, *Atmos. Env.*, 44, 1944–1945, 2010.
- Després, V. R., Huffman, J. A., Burrows, S. M., Hoose, C., Safatov, A. S., Buryak, G., Fröhlich-Nowoisky, J., Elbert, W., Andreae, M. O., Pöschl, U., and Jaenicke, R.:

- Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review, *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology*, 64, 15598, 2012.
- Deuel, H. und Neukom, H.: Über die Reaktion von Borsäure und Borax mit Polysacchariden und anderen hochmolekularen Polyoxy-Verbindungen, *Macr. Chem. Phys.*, 3, 13–30, 1949.
- Deutscher Wetterdienst: Pollenstatistik: <https://www.dwd.de/DE/leistungen/pollen/pollenstatistik.html?nn=16102>, zuletzt aufgerufen am: 25.07.2018.
- Deville, S., Viazzi, C., Leloup, J., Lasalle, A., Guizard, C., Maire, E., Adrien, J., and Gremillard, L.: Ice shaping properties, similar to that of antifreeze proteins, of a zirconium acetate complex, *PLOS ONE*, 6, 26474-26479, 2011.
- DeVries, A. L. and Wohlschlag, D. E.: Freezing Resistance in some antarctic fishes, *Science*, 163, 1073-1075, 1969.
- Diehl, K., Matthias-Maser, S., Jaenicke, R., and Mitra, S. K.: The ice nucleating ability of pollen: Part II. Laboratory studies in immersion and contact freezing modes, *Atmos. Res.*, 61, 125–133, 2002.
- Diehl, K., Quick, C., Matthias-Maser, S., and Jaenicke, R.: The ice nucleating ability of pollenmodes: Part I: Laboratory studies in deposition and condensation freezing modes, *Atmos. Res.*, 58, 75–87, 2001.
- Digitale Proteindatenbank: <http://www.rcsb.org>.
- Dreischmeier, K.: Eisnukleation und Glasbildung in wässrigen Saccharose-Lösungen, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 52 S., 2009.
- Dreischmeier, K.: Nachweis der Cystein-Oxidation in Proteinen mittels ATR-FTIR-Spektroskopie, Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld, 69 S., 2012.
- Dreischmeier, K.: Untersuchung der heterogenen Eisnukleation in wässrigen Pollensuspensionen, Masterarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 136 S., 2013.
- Dreischmeier, K., Budke, C., Wiehemeier, L., Kottke, T., and Koop, T.: Boreal pollen contain ice-nucleating as well as ice-binding 'antifreeze' polysaccharides, *Sci. Rep.*, 7, 41890–41908, 2017.
- Dreischmeier, K. and Drewel, A.-K.: Schwingungsspektroskopie an Biomolekülen: Physikalische Chemie - Praxis, Vertiefung, Praktikumsprotokoll, Universität Bielefeld, Bielefeld, 26 S., WiSe 2009/2010.
- Drori, R., Celik, Y., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Ice-binding proteins that accumulate on different ice crystal planes produce distinct thermal hysteresis dynamics, *Journal of the Royal Society, Interface*, 11, 20140526, 2014.
- Drori, R., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Experimental correlation between thermal hysteresis activity and the distance between antifreeze proteins on an ice surface, *RSC Adv.*, 5, 7848–7853, 2015a.

- Drori, R., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: When are antifreeze proteins in solution essential for ice growth inhibition?, *Langmuir*, 31, 5805–5811, 2015b.
- Drori, R., Li, C., Hu, C., Raiteri, P., Ro, A. L., Ward, M. D., and Kahr, B.: A Supramolecular Ice Growth Inhibitor, *J. Am. Chem. Soc.*, 138, 13396–13401, 2016.
- Duman, J. G.: Animal ice-binding (antifreeze) proteins and glycolipids: an overview with emphasis on physiological function, *J. Exp. Biol.*, 218, 1846–1855, 2015.
- Ebbinghaus, S., Meister, K., Born, B., DeVries, A. L., Gruebele, M., and Havenith, M.: Antifreeze glycoprotein activity correlates with long-range protein-water dynamics, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 12210–12211, 2010.
- Eickhoff, L.: Untersuchungen zur heterogenen Eisnukleation am molekularen Eisnukleator Zirkonium-(IV)-acetathydroxid & Aufbau und Inbetriebnahme eines Mikrofluidiksystems für Nukleationsexperimente, Masterarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 139 S., 2017.
- Eickhoff, L.: Kalibrationsfunktion Mikrofluidik, schriftliche Notiz, 2018.
- Eickhoff, L., Dreischmeier, K., Zipori, A., Sirotinskaya, V., Adar, C., Reicher, N., Braslavsky, I., Rudich, Y., and Koop, T.: Janus Behavior of Antifreeze Proteins: Ice Growth Inhibitors and Ice Nucleation Promoters, in Vorbereitung, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2018.
- Engdahl, A. K.: Handbook for the use of Calibration and Recrystallization scripts in Origin, Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld, 14 S., 2015.
- Epoch Times: Extremer Eingriff ins Erdklima: China will es in Tibet mit Silberjodid künstlich regnen lassen: <https://www.epochtimes.de/politik/welt/extremer-eingriff-ins-erdklima-china-will-es-in-tibet-mit-silberjodid-kuenstlich-regnen-lassen-a2414163.html>, zuletzt aufgerufen am: 12.07.2018.
- Fahrenfort, J.: Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds, *Spectroch. Acta*, 17, 698–709, 1961.
- Feeney, R., Burcham, T. S., and Yeh, Y.: Antifreeze glycoproteins from polar fish blood, *Ann. Rev. Biophys. Biophys Chem.*, 15, 59–78, 1986.
- Felgitsch, L., Baloh, P., Burkart, J., Mayr, M., Momken, M. E., Seifried, T. M., Winkler, P., Schmale III, D. G., and Grothe, H.: Birch leaves and branches as a source of ice-nucleating macromolecules, *Atmos. Chem. Phys.*, 18, 16063–16079, 2018.
- Fletcher, N. H.: Size Effect in Heterogeneous Nucleation, *The Journal of Chemical Physics*, 29, 572–576, 1958.
- Fröhlich-Nowoisky, J., Hill, T. C. J., Pummer, B. G., Yordanova, P., Franc, G. D., and Poeschl, U.: Ice nucleation activity in the widespread soil fungus *Mortierella alpina*, *Biogeosciences*, 12, 1057–1071, 2015.

- Fröhlich-Nowoisky, J., Kampf, C. J., Weber, B., Huffman, J. A., Pöhlker, C., Andreae, M. O., Lang-Yona, N., Burrows, S. M., Gunthe, S. S., Elbert, W., Su, H., Hoor, P., Thines, E., Hoffmann, T., Després, V. R., and Pöschl, U.: Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions, *Atmos. Res.*, 182, 346–376, 2016.
- Garnham, C. P., Campbell, R. L., and Davies, P. L.: Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 7363–7367, 2011a.
- Garnham, C. P., Campbell, R. L., Walker, V. K., and Davies, P. L.: Novel dimeric β -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites, *BMC Structural Biology*, 11, 1–11, 2011b.
- Geng, H., Liu, X., Shi, G., Bai, G., Ma, J., Chen, J., Wu, Z., Song, Y., Fang, H., and Wang, J.: Graphene Oxide Restricts Growth and Recrystallization of Ice Crystals, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 56, 997–1001, 2017.
- Goubet, F., Dupree, P., and Johansen, K. S.: Carbohydrate gel electrophoresis, *Methods Mol. Biol.*, 715, 81–92, 2011.
- Graham, L. A., Liou, Y.-C., Walker, V. K., and Davies, P. L.: Hyperactive antifreeze protein from beetles, *Nature: Scientific correspondents*, 388, 727, 1997.
- GREER: Informationen zu Birkenpollen (*Betula pendula*), beiliegende Informationsblätter, 2013-2015.
- Groot, C. C. M., Meister, K., DeVries, A. L., and Bakker, H. J.: Dynamics of the Hydration Water of Antifreeze Glycoproteins, *J. Phys. Chem. Lett.*, 7, 4836–4840, 2016.
- Gupta, R. and Deswal, R.: Antifreeze proteins enable plants to survive in freezing conditions, *J. Biosci.*, 39, 2014a.
- Gupta, R. and Deswal, R.: Refolding of β -stranded class I chitinases of *Hippophae rhamnoides* enhances the antifreeze activity during cold acclimation, *PLOS ONE*, 9, 91723–91733, 2014b.
- Gute, E. and Abbatt, J. P. D.: Oxidative Processing Lowers the Ice Nucleation Activity of Birch and Alder Pollen, *Geophys. Res. Lett.*, 45, 1647–1653, 2018.
- Güth, U.: SDS-PAGE: Arbeitsvorschrift PC III, schriftliche Mitteilung, 2003.
- Hader, J. D., Wright, T. P., and Petters, M. D.: Contribution of pollen to atmospheric ice nuclei concentrations, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 5433–5449, 2014.
- Haleva, L., Celik, Y., Bar-Dolev, M., Pertaya-Braun, N., Kaner, A., Davies, P. L., and Braslavsky, I.: Microfluidic Cold-Finger Device for the Investigation of Ice-Binding Proteins, *Biophys. J.*, 111, 1143–1150, 2016.
- Hansen, T. N., DeVries, A. L., and Baust, J. G.: Calorimetric analysis of antifreeze glycoproteins of the polar fish, *Dissostichus mawsoni*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1079, 169–173, 1991.

- Hansen, T. N. and Baust, J. G.: Differential scanning calorimetric analysis of antifreeze protein activity in the common mealworm, *Tenebrio molitor*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 957, 217–221, 1988.
- Hansen, T. N. and Baust, J. G.: Differential scanning calorimetric analysis of *Tenebrio molitor* antifreeze protein activity, *Cryobiology*, 26, 383–388, 1989.
- Harding, M. M., Anderberg, P. I., and Haymet, A. D. J.: 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish, *Eur. J. Biochem.*, 270, 1381–1392, 2003.
- Harding, M. M., Ward, L. G., and Haymet, A. D. J.: Type I 'antifreeze' proteins, *Eur. J. Biochem.*, 264, 653–665, 1999.
- Harrick, N. J.: Multiple Reflection Cells for Internal Reflection Spectrometry, *Anal. Chem.*, 34, 1964.
- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., and Harding, M. M.: Winter flounder "antifreeze" proteins: Synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 941–948, 1999.
- Heberle, J. and Ataka, K.: SEIDAS: Oberflächenverstärkte IR-Differenzspektroskopie zur funktionellen Untersuchung von Proteinmonolagen, *BIOspektrum*, 10, 2004.
- Hegg, D. A. and Baker, M. B.: Nucleation in the atmosphere, *Rep. Prog. Phys.*, 72, 56801, 2009.
- Helin, A., Sietio, O.-M., Heinonsalo, J., Back, J., Riekkola, M.-L., and Parshintsev, J.: Characterization of free amino acids, bacteria and fungi in size-segregated atmospheric aerosols in boreal forest: Seasonal patterns, abundances and size distributions, *Atmos. Chem. Phys.*, 17, 13089–13101, 2017.
- Hellma Analytics: Material und technische Informationen: Kennzeichnung von Küvetten für den UV-Bereich: <http://www.hellma-analytics.com/text/283/de/material-und-technische-informationen.html>, zuletzt aufgerufen am: 02.07.2018.
- Herbert, R. J., Murray, B. J., Whale, T. F., Dobbie, S. J., and Atkinson, J. D.: Representing time-dependent freezing behaviour in immersion mode ice nucleation, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 8501–8520, 2014.
- Hesse, M., Meier, H., and Zeeh, B.: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 7., überarb. Aufl., Thieme, Stuttgart, 2005.
- Hill, T. C. J., DeMott, P. J., Tobo, Y., Fröhlich-Nowoisky, J., Moffett, B. F., Franc, G. D., and Kreidenweis, S. M.: Sources of organic ice nucleating particles in soils, *Atmos. Chem. Phys.*, 16, 7195–7211, 2016.
- Hiranuma, N., Augustin-Bauditz, S., Bingemer, H., Budke, C., Curtius, J., Danielczok, A., Diehl, K., Dreischmeier, K., Ebert, M., Frank, F., Hoffmann, N., Kandler, K., Kiselev, A., Koop, T., Leisner, T., Möhler, O., Nillius, B., Peckhaus, A., Rose, D.,

- Weinbruch, S., Wex, H., Boose, Y., DeMott, P. J., Hader, J. D., Hill, T. C. J., Kanji, Z. A., Kulkarni, G., Levin, E. J. T., McCluskey, C. S., Murakami, M., Murray, B. J., Niedermeier, D., Petters, M. D., O'Sullivan, D., Saito, A., Schill, G. P., Tajiri, T., Tolbert, M. A., Welti, A., Whale, T. F., Wright, T. P., and Yamashita, K.: A comprehensive laboratory study on the immersion freezing behavior of illite NX particles: a comparison of 17 ice nucleation measurement techniques, *Atmos. Chem. Phys.*, 15, 2489–2518, 2015.
- Holt, C. B.: The effect of antifreeze proteins and poly(vinyl alcohol) on the nucleation of ice: A preliminary study, *CryoLetters*, 24, 323–330, 2003.
- Hoose, C., Kristjansson, J. E., Chen, J.-P., and Hazra, A.: A Classical-Theory-Based Parameterization of Heterogeneous Ice Nucleation by Mineral Dust, Soot, and Biological Particles in a Global Climate Model, *J. Atmos. Sci.*, 67, 2483–2503, 2010.
- Hoose, C. and Möhler, O.: Heterogeneous ice nucleation on atmospheric aerosols: a review of results from laboratory experiments, *Atmos. Chem. Phys.*, 12, 9817–9854, 2012.
- Hudait, A., Moberg, D. R., Qiu, Y., Odendahl, N., Paesani, F., and Molinero, V.: Preordering of water is not needed for ice recognition by hyperactive antifreeze proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2018a.
- Hudait, A., Odendahl, N., Qiu, Y., Paesani, F., and Molinero, V.: Ice-Nucleating and Antifreeze Proteins Recognize Ice through a Diversity of Anchored Clathrate and Ice-like Motifs, *J Am Chem Soc*, 140, 4905–4912, 2018b.
- Huffman, J. A., Prenni, A. J., DeMott, P. J., Pöhlker, C., Mason, R. H., Robinson, N. H., Fröhlich-Nowoisky, J., Tobo, Y., Després, V. R., Garcia, E., Gochis, D. J., Harris, E., Müller-Germann, I., Ruzene, C., Schmer, B., Sinha, B., Day, D. A., Andreae, M. O., Jimenez, J. L., Gallagher, M., Kreidenweis, S. M., Bertram, A. K., and Pöschl, U.: High concentrations of biological aerosol particles and ice nuclei during and after rain, *Atmos. Chem. Phys.*, 13, 6151–6164, 2013.
- Inada, T., Koyama, T., Goto, F., and Seto, T.: Inactivation of ice nucleating activity of silver iodide by antifreeze proteins and synthetic polymers, *The journal of physical chemistry. B*, 116, 5364–5371, 2012.
- Inada, T., Koyama, T., Tomita, H., Fuse, T., Kuwabara, C., Arakawa, K., and Fujikawa, S.: Anti-Ice Nucleating Activity of Surfactants against Silver Iodide in Water-in-Oil Emulsions, *The journal of physical chemistry. B*, 121, 6580–6587, 2017.
- Inada, T. and Lu, S.-S.: Thermal hysteresis caused by non-equilibrium antifreeze activity of poly(vinyl alcohol), *Chem. Phys. Lett.*, 394, 361–365, 2004.
- Jantsch, E.: Optimierung der Glasscheiben am BINARY, mündliche Mitteilung, 2014.
- Joung, Y. S. and Buie, C. R.: Aerosol generation by raindrop impact on soil, *Nature Comm.*, 6, 2015.

- Kanji, Z. A., Ladino, L. A., Wex, H., Boose, Y., Burkert-Kohn, M., Cziczo, D. J., and Krämer, M.: Overview of Ice Nucleating Particles: Chapter I, Meteorological Monographs, 58, 1.1-1.33, 2017.
- Kieft, T. L. and Ruscelli, T.: Characterization of Biological Ice Nuclei from a Lichen, *J. Bacteriol.*, 172, 3519–3523, 1990.
- Klocke, J.: Konzentrations- und pH-Wert-abhängige Untersuchung der Eisrekristallisation in wässrigen Zirkoniumacetat-Saccharose-Lösungen, Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld, 9 S., 2015.
- Knight, C. A., Cheng, C. C., and DeVries, A. L.: Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes, *Biophys. J.*, 59, 409–418, 1991.
- Knopf, D. A., Alpert, P. A., and Wang, B.: The Role of Organic Aerosol in Atmospheric Ice Nucleation: A Review, *ACS Earth Space Chem.*, 2, 168–202, 2018.
- Knopf, D. A., Alpert, P. A., Wang, B., and Aller, J. Y.: Stimulation of ice nucleation by marine diatoms, *Nature Geosci.*, 4, 88–90, 2010.
- Kobashigawa, Y., Nishimiya, Y., Miura, K., Ohgiya, S., Miura, A., and Tsuda, S.: A part of ice nucleation protein exhibits the ice-binding ability, *FEBS Lett.*, 579, 1493–1497, 2005.
- Koop, T.: Die Bildungsmechanismen von Polaren Stratosphärenwolken - Gefrierexperimente und Nukleationsstatistik, Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 144 S., 1996.
- Koop, T.: Homogeneous Ice Nucleation in Water and Aqueous Solutions, *Z. Phys. Chem.*, 218, 1231–1258, 2004.
- Koop, T.: Grundlagen der Atmosphärischen Chemie, Vorlesung, Universität Bielefeld, WiSe 2008/2009.
- Koop, T.: Atmosphärische Chemie für Fortgeschrittene, Vorlesung, Universität Bielefeld, SoSe 2010a.
- Koop, T.: Kondensierte wässrige Materie, Vorlesung, Universität Bielefeld, SoSe 2010b.
- Koop, T.: The seeds of ice in clouds, *Nature (News & Views; Forum: Atmospheric science)*, 498, 302, 2013.
- Koop, T., Luo, B. P., Biermann, U. M., Crutzen, P. J., and Peter, T.: Freezing of HNO₃/H₂SO₄/H₂O solutions at stratospheric temperatures: Nucleation statistics and experiments, *J. Phys. Chem. A*, 101, 1117–1133, 1997.
- Koop, T., Luo, B. P., Tsias, A., and Peter, T.: Water activity as the determinant for homogeneous ice nucleation in aqueous solutions, *Nature*, 406, 611–614, 2000.
- Koop, T. and Zobrist, B.: Parameterizations for ice nucleation in biological and atmospheric systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11, 10839–10850, 2009.

- Koop, T. and Murray, B. J.: A physically constrained classical description of the homogeneous nucleation of ice in water, *J. Chem. Phys.*, 145, 211915-1-211915-11, 2016.
- Kottke, T.: Phosphorylierung von Proteinen, mündliche Mitteilung, Bielefeld, 2018.
- Kristiansen, E. and Zachariassen, K. E.: The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis, *Cryobiology*, 51, 262–280, 2005.
- Krog, J. O., Zachariassen, K. E., Larsen, B., and Smidsrød, O.: Thermal buffering in Afro-alpine plants due to nucleating agent-induced water freezing, *Nature*, 282, 300–301, 1979.
- Kuiper, M. J., Lankin, C., Gauthier, S. Y., Walker, V. K., and Davies, P. L.: Purification of antifreeze proteins by adsorption to ice, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 300, 645–648, 2003.
- Kuiper, M. J., Morton, C. J., Abraham, S. E., and Gray-Weale, A.: The biological function of an insect antifreeze protein simulated by molecular dynamics, *eLife Science Publication*, 14 S., 2015.
- Kunert, A. T.: Ernte von *M. alpina*, E-Mail, 2017.
- Levine, J.: Statistical explanation of spontaneous freezing, NACA TN, 1950.
- Lide, D. R.: CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86. Aufl., 2660 S., 2005.
- Lifshitz, I. M. and Slyozov, V. V.: The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 19, 35–50, 1961.
- Lindow, S. E., Army, D. C., and Upper, C. D.: Bacterial Ice Nucleation: A Factor in Frost Injury to Plants, *Plant Physiol.*, 70, 1084–1089, 1982.
- Linkam Scientific: BCS196 specifications: <http://www.linkam.co.uk/bcs196-specifications>, zuletzt aufgerufen am: 13.11.2018.
- Linkam Scientific: LTS120 specifications: <http://www.linkam.co.uk/lts120-specifications>, zuletzt aufgerufen am: 15.06.2018.
- Liou, Y.-C., Davies, P. L., and Jia, Z.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of insect antifreeze protein from the beetle *Tenebrio molitor*, *Acta Crystallographica D*, 56, 354–356, 1999.
- Liou, Y.-C., Tocilj, A., Davies, P. L., and Jia, Z.: Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein, *Nature Letters*, 406, 2000.
- Liu, K., Wang, C., Ma, J., Shi, G., Yao, X., Fang, H., Song, Y., and Wang, J.: Janus effect of antifreeze proteins on ice nucleation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113, 14739–14744, 2016.
- Lohmann, U. and Diehl, K.: Sensitivity studies of the importance of dust ice nuclei for the indirect aerosol effect on stratiform mixed-phase clouds, *J. Atmos. Sci.*, 63, 968–982, 2005.

- Lu, M., Wang, B., Li, Z., Fei, Y., Wei, L., and Gao, S.: Differential scanning calorimetric and circular dichroistic studies on plant antifreeze proteins, *J. Therm. Anal. Cal.*, 67, 689–698, 2002.
- Lundheim, R.: Physiological and ecological significance of biological ice nucleators, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 357, 937–943, 2002.
- Mangiagalli, M., Bar-Dolev, M., Tedesco, P., Natalello, A., Kaleda, A., Brocca, S., Pascale, D. d., Pucciarelli, S., Miceli, C., Braslavsky, I., and Lotti, M.: Cryo-protective effect of an ice-binding protein derived from Antarctic bacteria, *FEBS J*, 284, 163–177, 2017.
- Manninen, H. E., Back, J., Sihto-Nissila, S.-L., Huffman, J. A., Pessi, A.-M., Hiltunen, V., Aalto, P. P., Hidalgo, P. J., Hari, P., Saarto, A., Kulmala, M., and Petaja, T.: Patterns in airborne pollen and other primary biological aerosol particles (PBAP), and their contribution to aerosol mass and number in a boreal forest, *Bor. Envir. Res.*, 19, 383–405, 2014.
- Marculli, C.: Deposition nucleation viewed as homogeneous or immersion freezing in pores and cavities, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 2071–2104, 2014.
- Marculli, C., Gedamke, S., Peter, T., and Zobrist, B.: Efficiency of immersion mode ice nucleation on surrogates of mineral dust, *Atmos. Chem. Phys.*, 7, 5081–5091, 2007.
- Margesin, R., Neuner, G., and Storey, K. B.: Cold-loving microbes, plants, and animals-fundamental and applied aspects, *Naturwissenschaften*, 94, 77–99, 2007.
- Marshall, C. B., Daley, M. E., Graham, L. A., Sykes, B. D., and Davies, P. L.: Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor*, *FEBS Lett*, 529, 261–267, 2002.
- Marshall, C. J., Basu, K., and Davies, P. L.: Ice-shell purification of ice-binding proteins, *Cryobiology*, 72, 258–263, 2016.
- Meister, K., Ebbinghaus, S., Xu, Y., Duman, J. G., DeVries, A. L., Gruebele, M., Leitner, D. M., and Havenith, M.: Long-range protein-water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 1617–1622, 2013.
- Meister, K., Strazdaite, S., DeVries, A. L., Lotze, S., Olijve, L. L. C., Voets, I. K., and Bakker, H. J.: Observation of ice-like water layers at an aqueous protein surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 111, 17732–17736, 2014.
- Merck KGaA: MilliQ(R)-Wasseraufbereitungssystem:
http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Milli-Q-Integral-Water-Purification-System-for-Ultrapure-Water,MM_NF-C72876, zuletzt aufgerufen am: 02.07.2018.

- Meunier, F. and Wilkinson, K. J.: Nonperturbing fluorescent labeling of polysaccharides, *Biomacromolecules*, 3, 857–864, 2002.
- Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S.: Hydration behavior at the ice-binding surface of the *Tenebrio molitor* antifreeze protein, *J. Phys. Chem. B*, 118, 4743–4752, 2014.
- Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S.: Interfacial water arrangement in the ice-bound state of an antifreeze protein: A molecular dynamics simulation study, *Langmuir*, 33, 5499–5510, 2017.
- Midya, U. S. and Bandyopadhyay, S.: Operation of Kelvin Effect in the Activities of an Antifreeze Protein: A Molecular Dynamics Simulation Study, *J. Phys. Chem. B*, 122, 3079–3087, 2018.
- Mizrahy, O., Bar-Dolev, M., Guy, S., and Braslavsky, I.: Inhibition of ice growth and recrystallization by zirconium acetate and zirconium acetate hydroxide, *PLOS ONE*, 8, 59540–59548, 2013.
- Mochizuki, K., Qiu, Y., and Molinero, V.: Promotion of Homogeneous Ice Nucleation by Soluble Molecules, *J. Am. Chem. Soc.*, 139, 17003–17006, 2017.
- Moffett, B. F.: Ice nucleation in mosses and liverworts, *Linbergia*, 38, 14–16, 2015.
- Morris, C. E., Sands, D. C., Glaux, C., Samsatly, J., Asaad, S., Moukahel, A. R., Goncalves, F. L. T., and Bigg, E. K.: Urediospores of rust fungi are ice nucleation active at -10 degrees C and harbor ice nucleation active bacteria, *Atmos. Chem. Phys.*, 13, 4223–4233, 2013.
- Morris, G. J. and Acton, E.: Controlled ice nucleation in cryopreservation - A review, *Cryobiology*, 66, 85–92, 2013.
- Müller-Esterl, W.: *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 1. Aufl., Elsevier, Spektrum Akad. Verl., München [u.a.], XX, 656 S., 2004.
- Murphy, D. M. and Koop, T.: Review of the vapour pressures of ice and supercooled water for atmospheric applications, *Q. J. R. Meteorol. Soc.*, 131, 1539–1565, 2005.
- Murray, B. J., Broadley, S. L., Wilson, T. W., Atkinson, J. D., and Wills, R. H.: Heterogeneous freezing of water droplets containing kaolinite particles, *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 4191–4207, 2011.
- Murray, B. J., O'Sullivan, D., Atkinson, J. D., and Webb, M. E.: Ice nucleation by particles immersed in supercooled cloud droplets, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 6519–6554, 2012.
- NASA: U. S. Standard Atmosphere 1976, 1976.
- National Instruments: LabVIEW: <http://www.ni.com/de-de/shop/labview/download.html>, zuletzt aufgerufen am: 20.06.2018.

- Neue Westfälische: Warum erfrieren Fische nicht?: Eingebauter Schutz (Kinderseite), Neue Westfälische, 02.12.2017, 2017.
- Neuhaus, P.: Silberfärbung nach Coomassie Blue, schriftliche Mitteilung, 2015.
- Nickel, M.: Untersuchung der homogenen Nukleation in verschiedenen Systemen und der heterogenen Nukleation mit Mikroklin und Snomax, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 28 S., 2013.
- Niedermeier, D., Hartmann, S., Shaw, R. A., Covert, D., Mentel, F., Schneider, J., Poulain, L., Reitz, P., Spindler, C., Clauss, T., Kiselev, A., Hallbauer, E., Wex, H., and K. Mildenerger, K. and Stratmann, F.: Heterogeneous freezing of droplets with immersed mineral dust particles – measurements and parameterization, *Atmos. Chem. Phys.*, 10, 3601–3614, 2010.
- Niedermeier, D., Shaw, R. A., Hartmann, S., Wex, H., Clauss, T., Voigtländer, J., and Stratmann, F.: Heterogeneous ice nucleation: exploring the transition from stochastic to singular freezing behavior, *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 8767–8775, 2011.
- Nutt, D. R. and Smith, J. C.: Dual function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 13066–13073, 2008.
- Ogawa, S., Koga, M., and Osanai, S.: Anomalous ice nucleation behavior in aqueous polyvinyl alcohol solutions, *Chem. Phys. Lett.*, 480, 86–89, 2009.
- Olijve, L. L. C., Meister, K., DeVries, A. L., Duman, J. G., Guo, S., Bakker, H. J., and Voets, I. K.: Blocking rapid ice crystal growth through nonbasal plane adsorption of antifreeze proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1–6, 2016a.
- Olijve, L. L. C., Vrielink, A. S. O., and Voets, I. K.: A Simple and Quantitative Method to Evaluate Ice Recrystallization Kinetics Using the Circle Hough Transform Algorithm, *Crystal Growth & Design*, 16, 4190–4195, 2016b.
- Ostwald, W.: Über die vermeintliche Isomerie des roten und gelben Quecksilberoxyds und die Oberflächenspannung fester Körper, *Z. Phys. Chem.*, 34, 495–503, 1900.
- O'Sullivan, D., Murray, B. J., Malkin, T. L., Whale, T. F., Umo, N. S., Atkinson, J. D., Price, H. C., Baustian, K. J., Browse, J., and Webb, M. E.: Ice nucleation by fertile soil dusts: Relative importance of mineral and biogenic components, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 1853–1867, 2014.
- O'Sullivan, D., Murray, B. J., Ross, J. F., and Webb, M. E.: The adsorption of fungal ice-nucleating proteins on mineral dusts: A terrestrial reservoir of atmospheric ice-nucleating particles, *Atmos. Chem. Phys.*, 16, 7879–7887, 2016.
- O'Sullivan, D., Murray, B. J., Ross, J. F., Whale, T. F., Price, H. C., Atkinson, J. D., Umo, N. S., and Webb, M. E.: The relevance of nanoscale biological fragments for ice nucleation in clouds, *Sci. Rep.*, 5, 8082–8088, 2015.

- Oude Vrielink, A. S., Aloï, A., Olijve, L. L. C., and Voets, I. K.: Interaction of ice binding proteins with ice, water and ions, *Biointerphases*, 11, 2016.
- Pandey, R., Usui, K., Livingstone, R. A., Fischer, S. A., Pfaendtner, J., Backus, E. H. G., Nagata, Y., Frohlich-Nowoisky, J., Schmuser, L., Mauri, S., Scheel, J. F., Knopf, D. A., Poschl, U., Bonn, M., and Weidner, T.: Ice-nucleating bacteria control the order and dynamics of interfacial water, *Sci. Adv.*, 2, e1501630, 2016.
- Papula, L.: *Mathematische Formelsammlung: Für Ingenieure und Naturwissenschaftler*, 9., überarbeitete Auflage, Vieweg, Wiesbaden, 546 S., 2006.
- Pedernera, D. A.: *Glasbildung in Aerosolpartikeln der oberen Troposphäre*, Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld, 177 S., 2008.
- Pedrotti, F. L., Pedrotti, L. S., Bausch, W., and Schmidt, H.: *Optik für Ingenieure: Grundlagen*, 4., bearb. Aufl., Springer, Berlin, 848 S., 2008.
- Pratt, K. A., DeMott, P. J., French, J. R., Wang, Z., Westphal, D. L., Heymsfield, A. J., Twohy, C. H., Prenni, A. J., and Prather, K. A.: In situ detection of biological particles in cloud ice-crystals, *Nature Geosci.*, 2, 398–401, 2009.
- PROzyme: Certificate of Analysis: Glyko(R) APTS, Informationsblatt, 2015.
- Pruppacher, H. R.: A new look at homogeneous ice nucleation in supercooled water drops, *J. Atmos. Sci.*, 52, 1924–1934, 1995.
- Pruppacher, H. R. and Klett, J. D.: *Microphysics of Clouds and Precipitation*, 2. Aufl., Atmospheric and Oceanographic Sciences Library, 18, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 945 S., 1997.
- Pummer, B. G.: *Ice nucleation activity of pollen and fungal spores*, Dissertation, Technische Universität Wien, Wien, 153 S., 2013.
- Pummer, B. G., Atanasova, L., Bauer, H., Bernardi, J., Druzhinina, I. S., Froehlich-Nowoisky, J., and Grothe, H.: Spores of many common airborne fungi reveal no ice nucleation activity in oil immersion freezing experiments, *Biogeosciences*, 10, 8083–8091, 2013a.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Bleicher, S., and Grothe, H.: Suspendable macromolecules are responsible for ice nucleation activity of birch and conifer pollen, *Atmos. Chem. Phys.*, 12, 2541–2550, 2012.
- Pummer, B. G., Bauer, H., Bernardi, J., Chazallon, B., Facq, S., Lendl, B., Whitmore, K., and Grothe, H.: Chemistry and morphology of dried-up pollen suspension residues, *J. Raman Spectrosc.*, 44, 1654–1658, 2013b.
- Pummer, B. G., Budke, C., Augustin-Bauditz, S., Niedermeier, D., Felgitsch, L., Kampf, C. J., Huber, R. G., Liedl, K. R., Loerting, T., Moschen, T., Schauperl, M., Tollinger, M., Morris, C. E., Wex, H., Grothe, H., Pöschl, U., Koop, T., and Fröhlich-Nowoisky, J.: Ice nucleation by water-soluble macromolecules, *Atmos. Chem. Phys.*, 15, 4077–4091, 2015.

- Ramlöv, H., Vries, A. L. de, and Wilson, P. W.: Antifreeze glycoproteins from the antarctic fish *Dissostichus mawsoni* studies by differential scanning calorimetry (DSC) in combination with nanolitre osmometry, *CryoLetters*, 26, 73–84, 2005.
- Raymond, J. A. and DeVries, A. L.: Adsorption inhibition as a mechanism of freezing resistance in polar fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 2589–2593, 1977.
- Rehm, H. and Letzel, T.: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 7., überarbeitete und aktualisierte Auflage, Experimentator, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, 406 S., 2016.
- Reicher, N., Segev, L., and Rudich, Y.: The Weizmann Supercooled Droplets Observation on a Microarray (WISDOM) and application for ambient dust, *Atmos. Meas. Tech.*, 1–25, 2017.
- Riechers, B.: Entwicklung einer Mikrofluidik-Struktur zur Herstellung von Tropfen für die Untersuchung der homogenen Nukleation, Universität Bielefeld, Masterarbeit, 2011.
- Riechers, B., Wittbracht, F., Huetten, A., and Koop, T.: The homogeneous ice nucleation rate of water droplets produced in a microfluidic device and the role of temperature uncertainty, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15, 5873–5887, 2013.
- Sabadasch, V.: Können molekulare Eisnukleatoren gleichzeitig Eis strukturieren?, Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld, 7 S., 2017.
- Schäppi, C. F., Taylor, P. E., Pain, M. C. F., Cameron, P. A., Dent, A. W., and Staff, I. A. and Suphioglu, C.: Concentrations of major grass group 5 allergens in pollen grains and atmospheric particles: implications for hay fever and allergic asthma sufferers sensitized to grass pollen allergens, *Clin. Exp. Allergy*, 29, 633–641, 1999.
- Schmid, F.-X.: Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry, *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–4, 2001.
- Schmitz, C. H. J., Rowat, A. C., Koester, S., and Weitz, D. A.: Dropspots: A picoliter array in a microfluidic device, *Lab on a Chip*, 9, 44–49, 2009.
- Schnell, R. C. and Vali, G.: Biogenic Ice Nuclei: Part II. Biological sources, *J. Atmos. Sci.*, 33, 1976.
- Schrod, J., Weber, D., Druecke, J., Keleshis, C., Pikridas, M., Ebert, M., Cvetkovic, B., Nickovic, S., Marinou, E., Baars, H., Ansmann, A., Vrekoussis, M., Mihalopoulos, N., Sciare, J., Curtius, J., and Bingemer, H. G.: Ice nucleating particles over the Eastern Mediterranean measured by unmanned aircraft systems, *Atmos. Chem. Phys.*, 17, 4817–4835, 2017.
- ScionCorp: ScionImage0.4: <https://scion-image.software.informer.com/0.4/>, zuletzt aufgerufen am: 10.10.2018.

- Scotter, A. J., Marshall, C. B., Graham, L. A., Gilbert, J. A., Garnham, C. P., and Davies, P. L.: The basis for hyperactivity of antifreeze proteins, *Cryobiology*, 53, 229–239, 2006.
- Shimadzu Scientific Instruments, I.: Bedienungsanleitung Spektrometer, 1995.
- Sicheri, F. and Yang, D. S.C.: Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder, *Nature*, 375, 427–431, 1995.
- Snomax(R)International: Snomax(R): <http://www.snomax.com/de/>, zuletzt aufgerufen am: 20.07.2018.
- Spektrum.de: Klimaschutz: Rettet uns das Geoengineering?: <https://www.spektrum.de/news/rettet-uns-das-geoengineering/1549513>, zuletzt aufgerufen am: 20.07.2018.
- Stank, T. J.: Eignet sich Guanidiniumchlorid zur Charakterisierung biologischer Eiskeime?, *Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld*, 2018.
- Steinke, I., Funk, R., Busse, J., Iturri, A., Kirchen, S., Leue, M., Moehler, O., Schwartz, T., Schnaiter, M., Sierau, B., Toprak, E., Ullrich, R., Ulrich, A., Hoose, C., and Leisner, T.: Ice nucleation activity of agricultural soil dust aerosols from Mongolia, Argentina, and Germany, *J. Geophys. Res. - Atmospheres*, 121, 13559–13576, 2016.
- TA Instruments: TA Instruments: Dynamische Differenzkalorimeter: <http://www.tainstruments.com>, zuletzt aufgerufen am: 08.06.2018.
- Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A., and Tsuda, S.: Effect of annealing time of an ice crystal on the activity of type III antifreeze protein, *FEBS J*, 274, 6469–6476, 2007.
- Tang, M., Cziczko, D. J., and Grassian, V. H.: Interactions of Water with Mineral Dust Aerosol: Water Adsorption, Hygroscopicity, Cloud Condensation, and Ice Nucleation, *Chem Rev*, 116, 4205–4259, 2016.
- Tarn, M. D., Sikora, S. N. F., Porter, G. C. E., O'Sullivan, D., Adams, M., Whale, T. F., Harrison, A. D., Vergara-Temprado, J., W., T. W., Shim, J.-U., and Murray, B. J.: The study of atmospheric ice-nucleating particles via microfluidically generated droplets, *Microfluidics and nanofluidics*, 22, 52, 2018.
- ThermoFisher Scientific: Pierce (TM) Unstained Protein MW Marker: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26610>, zuletzt aufgerufen am: 02.07.2018.
- Tobo, Y.: An improved approach for measuring immersion freezing in large droplets over a wide temperature range, *Sci. Rep.*, 6, 32930–329412, 2016.
- Tobo, Y., DeMott, P. J., Hill, T. C. J., Prenni, A. J., Swoboda-Colberg, N. G., Franc, G. D., and Kreidenweis, S. M.: Organic matter matters for ice nuclei of agricultural soil origin, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 8521–8531, 2014.

- Turnbull, D.: Kinetics of Heterogeneous Nucleation, *J. Chem. Phys.*, 18, 198–203, 1950.
- Turnbull, D. and Fisher, J. C.: Rate of Nucleation in Condensed Systems, *J. Chem. Phys.*, 17, 71–73, 1949.
- Vali, G.: Quantitative Evaluation of Experimental Results of the Heterogeneous Freezing Nucleation of Supercooled Liquids, *J. Atmos. Sci.*, 402–409, 1970.
- Vali, G.: Freezing Rate Due to Heterogeneous Nucleation, *J. Atmos. Sci.*, 51, 1843–1856, 1994.
- Vali, G.: Principles of Ice Nucleation: https://www.researchgate.net/publication/236016610_Principles_of_ice_nucleation, zuletzt aufgerufen am: 19.11.2018.
- Vali, G.: Ice Nucleation - Theory: A Tutorial: <http://www-das.uwyo.edu/~vali/>, zuletzt aufgerufen am: 19.11.2018.
- Vali, G.: Repeatability and randomness in heterogeneous freezing nucleation, *Atmos. Chem. Phys.*, 8, 5017–5031, 2008.
- Vali, G.: Interpretation of freezing nucleation experiments: singular and stochastic; sites and surfaces, *Atmos. Chem. Phys.*, 14, 5271–5294, 2014.
- Vali, G. and Stansbury, E. J.: time-dependent characteristics of the heterogeneous nucleation of ice, *Can. J. Phys.*, 44, 477–502, 1966.
- Voets, I. K.: From ice-binding proteins to bio-inspired antifreeze materials, *Soft matter*, 13, 4808–4823, 2017.
- von Blohn, N., Mitra, S. K., Diehl, K., and Borrmann, S.: The ice nucleating ability of pollen: Part III: New laboratory studies in immersion and contact freezing modes including more pollen types, *Atmos. Res.*, 78, 182–189, 2005.
- Vonnegut, B.: The Nucleation of Ice Formation by Silver Iodide, *Journal of Applied Physics*, 18, 593–595, 1947.
- Vonnegut, B. and Baldwin, M.: Repeated nucleation of a supercooled water sample that contains silver iodide particles, *J. Climat. Appl. Met.*, 23, 486–490, 1983.
- Voorhees, P. W. and Glicksman, M. E.: Solution to the multi-particle diffusion problem with applications to Ostwald ripening: I. Theory, *Acta Metallurgica*, 32, 2001–2011, 1984.
- Wagner, C.: Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen (Ostwald-Reifung), *Zeitschrift für Elektrochemie*, 65, 581–591, 1961.
- Walters, K. R., JR., Serianni, A. S., Sformo, T., Barnes, B. M., and Duman, J. G.: A nonprotein thermal hysteresis-producing xylomannan antifreeze in the freeze-tolerant Alaskan beetle *Upis ceramoides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 20210–20215, 2009.

- Walters, K. R., JR., Serianni, A. S., Voituron, Y., Sformo, T., Barnes, B. M., and Duman, J. G.: A thermal hysteresis-producing xylomannan glycolipid antifreeze associated with cold tolerance is found in diverse taxa, *J. Comp. Physiol. B*, 181, 631–640, 2011.
- Wang, B., Harder, T. H., Kelly, S. T., Piens, D. S., China, S., Kovarik, L., Keiluweit, M., Arey, B. W., Gilles, M. K., and Laskin, A.: Airborne soil organic particles generated by precipitation, *Nature Geosci.*, 9, 433–437, 2016.
- Ward, P. J. and DeMott, P. J.: Preliminary Experimental Evaluation of Snomax (TM) Snow Inducer, *Nucleus Pseudomonas syringae*, as an Artificial Ice for Weather Modification, *The Journal of Weather Modification*, 21, 9–13, 1989.
- Weng, L., Swei, A., and Toner, M.: Role of synthetic antifreeze agents in catalyzing ice nucleation, *Cryobiology*, 84, 91–94, 2018.
- Wex, H., Augustin-Bauditz, S., Boose, Y., Budke, C., Curtius, J., Diehl, K., Dreyer, A., Frank, F., Hartmann, S., Hiranuma, N., Jantsch, E., Kanji, Z. A., Kiselev, A., Koop, T., Moehler, O., Niedermeier, D., Nillius, B., Roesch, M., Rose, D., Schmidt, C., Steinke, I., and Stratmann, F.: Intercomparing different devices for the investigation of ice nucleating particles using Snomax (R) as test substance, *Atmos. Chem. Phys.*, 15, 1463–1485, 2015.
- Whale, T. F., Rosillo-Lopez, M., Murray, B. J., and Salzmann, C. G.: Ice Nucleation Properties of Oxidized Carbon Nanomaterials, *J. Phys. Chem. Lett.*, 6, 3012–3016, 2015.
- Wiehemeier, L.: Eisbindende Eigenschaften von Birkenpollen, *Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld*, 9 S., 2015.
- Wilson, T. W., Ladino, L. A., Alpert, P. A., Breckels, M. N., Brooks, I. M., Browse, J., Burrows, S. M., Carslaw, K. S., Huffman, J. A., Judd, C., Kilthau, W. P., Mason, R. H., McFiggans, G., Miller, L. A., Nájera, J. J., Polishchuk, E., Rae, S., Schiller, C. L., Si, M., Temprado, J. V., Whale, T. F., Wong, J. P. S., Wurl, O., Yakobi-Hancock, J. D., Abbatt, J. P. D., Aller, J. Y., Bertram, A. K., Knopf, D. A., and Murray, B. J.: A marine biogenic source of atmospheric ice-nucleating particles, *Nature*, 525, 234–238, 2015.
- Wolf, J.-L.: Einfluss von Polyvinylalkohol auf die Eisnukleation in emulgierten wässrigen Lösungen, *Forschungspraktikum, Universität Bielefeld, Bielefeld*, 6 S., 2018.
- Wright, T. P., Hader, J. D., McMeeking, G. R., and Petters, M. D.: High Relative Humidity as a Trigger for Widespread Release of Ice Nuclei, *Aerosol Sci. Tech.*, 48, 1–5, 2014.
- Xu, H., Griffith, M., Patten, C. L., and Glick, B. R.: Isolation and characterization of an antifreeze protein with ice nucleation activity from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2, *Can. J. Microbiol.*, 44, 64–73, 1998.

- Yaish, M. W. F., Doxey, A. C., McConkey, B. J., Moffatt, B. A., and Griffith, M.: Cold-active winter rye glucanases with ice-binding capacity, *Plant Physiol.*, 141, 1459–1472, 2006.
- Yamashita, Y., Kawahara, H., and Obata, H.: Identification of a Novel Anti-ice-nucleating Polysaccharide from *Bacillus thuringiensis* YY529, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 948–954, 2014.
- Yeh, Y. and Feeney, R. E.: Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function, *Chem. Rev.*, 96, 601–618, 1996.
- Yu, S., Yin, L., and Mu, S.: Discovery of an antifreeze protein in the leaves of *Ammopiptanthus nanus*, *Can. J. Plant Sci.*, 90, 35–40, 2010.
- Zachariassen, K. E. and Hammel, H. T.: Nucleating agents in the haemolymph of insects tolerant to freezing, *Nature*, 262, 285–287, 1976.
- Zachariassen, K. E. and Kristiansen, E.: Ice nucleation and antinucleation in nature, *Cryobiology*, 41, 257–279, 2000.
- Zalis, S.: Quantitative Evaluation of Ice Recrystallization Inhibition by Ice Binding Proteins, Masterarbeit, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, 57 S., 2015.
- ZEIT online: Die Regenmacher: Salziger Regen: <https://www.zeit.de/wissen/umwelt/2010-04/erde-sd-wettermodifikation/seite-2>, zuletzt aufgerufen am: 23.07.2018.
- Zobrist, B., Koop, T., Luo, B. P., Marcolli, C., and Peter, T.: Heterogeneous Ice Nucleation Rate Coefficient of Water Droplets Coated by a Nonadecanol Monolayer, *J. Phys. Chem. C*, 111, 2149–2155, 2007.
- Zobrist, B., Marcolli, C., Pedernera, D. A., and Koop, T.: Do atmospheric aerosols form glasses?, *Atmos. Chem. Phys.*, 8, 5221–5244, 2008a.
- Zobrist, B., Marcolli, C., Peter, T., and Koop, T.: Heterogeneous ice nucleation in aqueous solutions: the role of water activity, *J. Phys. Chem. A*, 112, 3965–3975, 2008b.

Anhang

A.1. Korrekturfunktionen für $K(T)$

Unterhalb einer Temperatur von -20 °C überlagert sich die durch die Probe ausgelöste Eisnukleation am BINARY mit der Hintergrundnukleation, die durch die Glassubstratoberfläche oder vereinzelt durch Staubpartikel hervorgerufen wird, sodass eine Korrektur durchgeführt werden muss. Dabei wird von $K(T)_{\text{Messung}}$ ([Gleichung \(2.20\)](#)) der Probenmessung für eine bestimmte Temperatur T der entsprechende $K(T)_{\text{H}_2\text{O}}$ -Wert für Wasser abgezogen ([Gleichung \(A.1\)](#)) und anschließend aus dem korrigierten $K(T)_{\text{Korrektur}}$ die kumulativen Keimspektren $n_x(T)$ für die Probe über die [Gleichungen \(2.21\)–\(2.23\)](#) berechnet. $K(T)_{\text{H}_2\text{O}}$ ergibt sich ebenfalls aus [Gleichung \(2.20\)](#), indem $f_{\text{Eis}}(T)_{\text{H}_2\text{O}}$ über eine Fitfunktion ([\(A.2\)](#)) angepasst wird ([Abbildung A.1](#); [Tabelle A.1](#)).

$$K(T)_{\text{Korrektur}} = K(T)_{\text{Messung}} - K(T)_{\text{H}_2\text{O}} \quad (\text{A.1})$$

$$f_{\text{Eis}}(T)_{\text{H}_2\text{O}} = A_1 \cdot \left(1 + \exp\left(\frac{T - x_0}{dx}\right) \right)^{-1} \quad (\text{A.2})$$

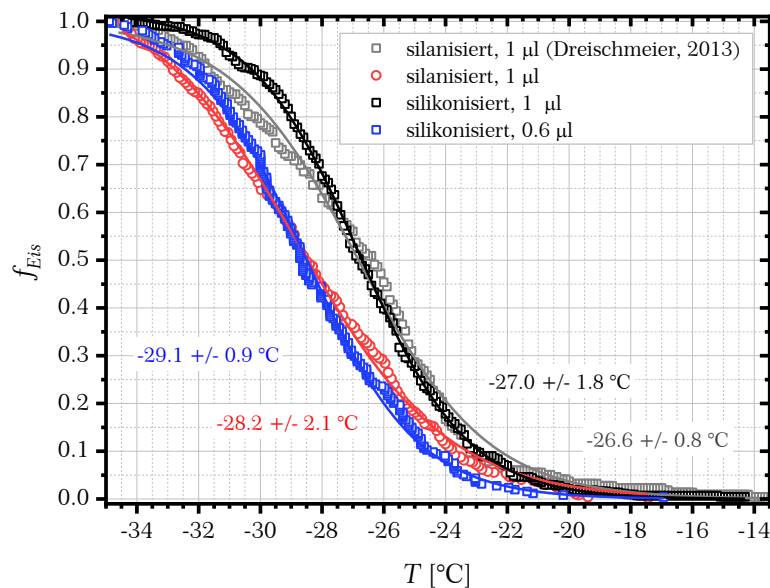


Abbildung A.1: Kumulativer Eisanteil f_{Eis} in Abhängigkeit von der Temperatur bei einer Kühlrate von -1 °C min^{-1} für verschiedene Beschichtungen des BINARY-Glasträgers und Tropfenvolumina. In der Masterarbeit (Dreischmeier, 2013) wurde nicht frisch destilliertes Wasser verwendet, sodass sich für diese Messungen auf dem selbst präparierten, silanisierten Glas eine andere Wasserkurve (grau) ergab als für das in dieser Arbeit verwendete frisch destillierte Wasser (rot). Zudem wurde mit 1 μl (schwarz) und 0,6 μl (blau) großen Probentropfen auf den kommerziell erworbenen silikonisierten Glasscheiben gemessen. Die Anpassungsgraphen ergeben sich aus der Boltzmannfunktion ([\(A.2\)](#)). Die angegebenen Temperaturen entsprechen den Mittelwerten der T_{50} -Werte der jeweiligen Einzelmessungen sowie den dazugehörigen Standardabweichungen und können daher etwas von dem T_{50} -Wert der dargestellten kombinierten Messkurven abweichen.

Tabelle A.1: Fitparameter für die f_{Eis} -Kurven der BINARY-Wassermessungen bei verschiedenen Glasbeschichtungen oder Tropfengrößen bei einer Kühlrate von -1 °C min^{-1} . In der Masterarbeit (Dreischmeier, 2013) wurde nicht frisch destilliertes Wasser verwendet, sodass eine andere Wasserkurve erhalten wurde. Die f_{Eis} -Kurven wurden wenn möglich kombiniert, um die Korrektur im eiskeimrelevanten Temperaturbereich $\geq -23\text{ °C}$ zu vereinfachen (Zeilen 4 + 5).

Wasser; Messbedingungen	A_1	$x_0\text{ [°C]}$	$dx\text{ [°C]}$	Gültigkeitsbereich	verwendeter Bereich
altes dest.; 1 μl , silanisieretes Glas (Dreischmeier, 2013)	1	-26.818	2.089	-13 bis -35 °C	$T < -23\text{ °C}$
bidest.; 1 μl , silanisieretes Glas	1.072	-28.785	2.419	-17 bis -35 °C	$T < -23\text{ °C}$
bidest.; 1 μl , silikonisiertes Glas	1.020	-26.775	1.751	-14 bis -35 °C	$T < -23\text{ °C}$
bidest.; 1 μl , silanisiert + silikonisiert	1.015	-27.576	2.049	-14 bis -35 °C	$T \geq -23\text{ °C}$
altes dest.+bidest.; 1 μl , silanisiert+silikonisiert	1.014	-27.445	2.075	-13 bis -35 °C	$T \geq -23\text{ °C}$
bidest.; 0.6 μl , silikonisiertes Glas	1	-28.492	1.799	-17 bis -35 °C	-17 bis -35 °C

A.2. Bestimmung der eisanteilkorrigierten Ratenkonstanten

Um über [Gleichung \(2.40\)](#) die auf einen theoretischen Eisanteil von Null korrigierten, wachstumsinhibierten Ratenkonstanten k_{10} berechnen zu können, muss zunächst der Wert für k_{d0} ermittelt werden. Dazu werden die über einen großen Eisanteibereich von $Q = 0.01-0.28$, der durch die Wahl verschieden konzentrierter Sucroselösungen erreichbar war, gemessenen diffusionslimitierten Ratenkonstanten k_d gegen Q graphisch aufgetragen (schwarze Kästchen) und mit [Gleichung \(2.37\)](#) angepasst (s. [Abbildung A.2](#) und [Tabelle A.2](#)). Die Anpassungskurve sollte für einen Eisanteil von $Q = 0$ auf den theoretisch erwarteten Wert $k_{d0}(Q \rightarrow 0) = k_{\text{LSW}} = 0.66\text{ }\mu\text{m}^3\text{ min}^{-1}$ (Budke et al., 2009) gehen, liegt hier allerdings bei einem höheren Wert von $k_{d0} = 1.045\text{ }\mu\text{m}^3\text{ min}^{-1}$. Auffällig ist dabei neben der starken Streuung der Messwerte auch eine Abweichung zu den früheren Werten von C. Budke (rote Kästchen) an demselben Messgerät mit derselben Messmethode, die einen k_{d0} -Wert von $0.65\text{ }\mu\text{m}^3\text{ min}^{-1}$ ergaben (Budke et al., 2009).

Eine Erklärung dieser Diskrepanz könnte in den unterschiedlichen Auswertungsprogrammen und der damit verbundenen unterschiedlichen Detektion der Kristallgrößen liegen. Werden die IRRINA-Messdaten aktuell über eine LabView™-gesteuerte Analysesoftware ausgewertet, geschah dieses zu den Anfängen der IRRINA-Messungen in der Arbeitsgruppe mit einem Image Tool-Programm. Auch in älteren, von C. Budke betreuten Arbeiten, deren Auswertungen auf dem LabView™-Programm basierten, ist eine Abweichung der gemessenen Ratenkonstanten in Sucroselösungen von denen in Budke et al. (2009) präsentierten offenbar, was die oben genannte

Vermutung erhärtet. Da in Klocke (2015) ein k_{d0} -Wert von $0.83 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bestimmt wurde, scheint ein weiterer, zeitabhängiger Faktor die Messdaten zu beeinflussen. In Betracht käme eine Verschlechterung der Wärmeleitungseigenschaften des Silberblocks, der nachweislich (Eickhoff, 2017) einen Temperaturversatz zu der von der Kühleinheit angezeigten Temperatur aufweist. In Budke et al. (2009) ist bei einer höheren Messtemperatur von $-6 \text{ }^\circ\text{C}$ wie bei den Daten dieser Arbeit bei einer Haltetemperatur von $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ eine größere Streuung der Messdaten zu erkennen. Diese Beobachtungen sprechen für einen (leichten) Temperaturversatz zu höheren Temperaturen bei den Messungen in dieser Arbeit.

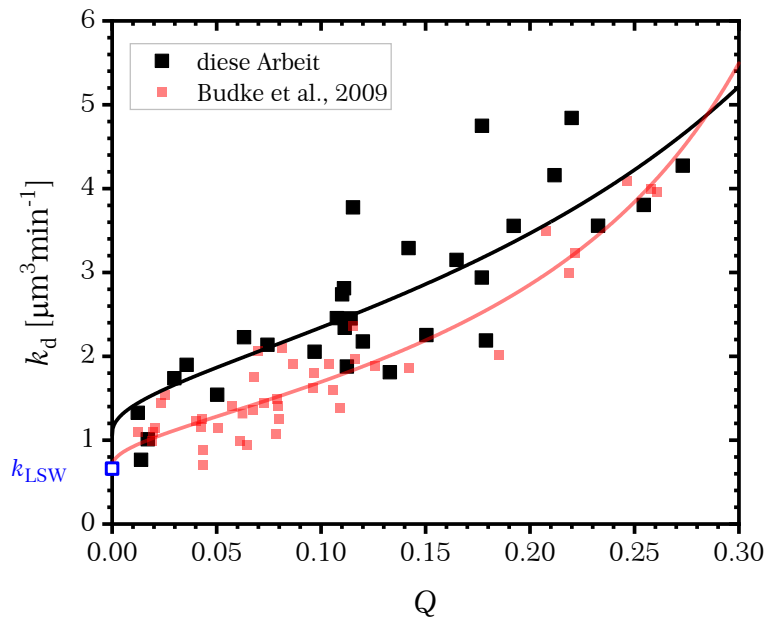


Abbildung A.2: Rekrystallisationsratenkonstanten in wässrigen 45 Gew%-igen Sucroslösungen bei $-8 \text{ }^\circ\text{C}$ Messtemperatur in Abhängigkeit vom Eisanteil. Die Ratenkonstante k_d nimmt mit sinkendem Eisanteil ab und sollte für einen imaginären Eisanteil von $Q=0$ den aus der LSW-Theorie (Gleichung (2.36)) vorhergesagten Wert $k_{LSW} = 0.66$ (blauer Kasten) annehmen. Während die Werte aus Budke et al. (2009) (rot) den theoretischen Verlauf gut beschreiben, weichen die Datenpunkte aus dieser Arbeit (schwarz) generell zu höheren k_d -Werten, ab und zeigen eine stärkere Streuung. Die Fitkurven wurden über Gleichung (2.37) erstellt.

Tabelle A.2: Die aus der Anpassung der Messdaten in (Abbildung A.2) mit Gleichung (2.37) erhaltenen Werte der diffusionslimitierten Ratenkonstante für $Q=0$, k_{d0} , und des Parameters p , im Vergleich mit den Werten von Budke et al. (2009). Messtemperatur der Rekrystallisationsmessungen war $-8 \text{ }^\circ\text{C}$.

	diese Arbeit	(Budke et al., 2009)
$k_{d0} [\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}]$	1.045 ± 0.111	0.65 ± 0.09
p	1.195 ± 0.058	1.318 ± 0.057

Diese Ratenkonstante k_{d0} wird zusammen mit der gemessenen Ratenkonstante k_1 zur Berechnung der eisanteilkorrigierten wachstumsinhibierten Ratenkonstante k_{i0} in Gleichung (2.40) eingesetzt. Der Wert für k_d ergibt sich dabei aus Gleichung (2.37) mit dem aus der Anpassung erhaltenen Parameter p und dem gemessenen Eisanteil Q . Bei der Bestimmung der auf den Eisanteil korrigierten diffusionslimitierten

Ratenkonstante k_{d0} der Referenzmessungen wird analog vorgegangen, k_d wird dabei quasi als k_1 in **Gleichung (2.40)** angesehen.

A.3. Primärsequenz von TmAFP

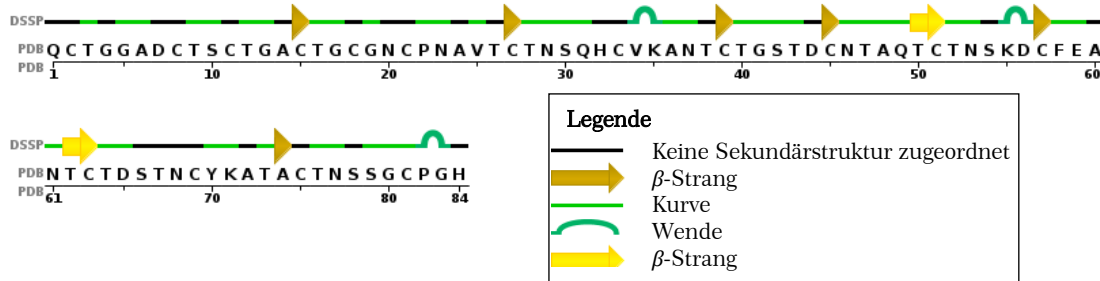


Abbildung A.3: Primärsequenz von TmAFP (1L1I) mit Zuteilung der Sekundärstrukturen. Mit Überarbeitung entnommen aus der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org/structure/1l1i>).

A.4. Erfassung der Thermischen Hysterese mittels DSC

Die Messungen der Thermischen Hysterese mittels Wärmestromkalorimetrie beruhen grundsätzlich auf dem Freiwerden der Kristallisationsenthalpie beim Gefrierprozess. Das Prinzip dieser Messungen liegt wie auch bei den Mikroskop-Messungen in dem Anschmelzen der gefrorenen Probe durch Aufheizen über den Schmelzpunkt und der Detektion des Gefrierprozesses beim darauf folgenden Abkühlen. Durch die Hysterese von Schmelz- und Gefrierpunkt setzt die Kristallisation verzögert und dann instantan ein, d.h. das Gefriersignal liegt vom Schmelzpunkt zu tieferen Temperaturen versetzt und zeigt einen zunächst starken Anstieg im Wärmestrom mit teilweise scharfen Spitzen im Signal.

A.4.1. Messprozedur

Es wurde für die Hysteresemessungen ein spezielles Temperaturprofil ausgearbeitet, wobei sich besonders an den Angaben in Hansen und Baust (1988;1989) orientiert wurde, das in **Abbildung A.4** an einem Beispiel graphisch veranschaulicht ist. Während der Messung kann die Funktion in der Software **TA Analysis Explorer** "Temperaturprofil ändern" ausgenutzt werden, da die Temperaturen, bei denen vom Aufwärm- in den Abkühlmodus gewechselt wird, und die Haltetemperaturen vor Beginn der Messung nicht genau bekannt sind.

Die Probe wird zunächst mit einer Rate von -20 °C min^{-1} abgekühlt, bis die Probe gefriert, was an dem für bulk-Lösungen typischen Schleifensignal erkennbar ist. Anschließend wird zunächst mit $+10 \text{ °C min}^{-1}$ auf eine Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur T_m aufgewärmt, bei der zur präzisen Erfassung des Schmelzsignals auf eine Rate von $+0.5 \text{ °C}$ gewechselt wird. Für wässrige Lösungen ohne Schmelzpunkterniedrigung wird in der Regel -7 °C als Ratenwechseltemperatur

eingestellt, bei wässrigen Lösungen mit nicht zu vernachlässigender Erniedrigung des Schmelzpunktes muss die bei der Wahl der Temperatur auch die Verbreiterung des Signals berücksichtigt werden. Falls keine Informationen über den Schmelzpunkt vorliegen, kann zunächst mit einer höheren Rate aufgewärmt werden, um die ungefähre Lage dessen abschätzen zu können und in einem zweiten Zyklus der Schmelzpunkt mit der niedrigen Rate von $+0.5 \text{ °C min}^{-1}$ ermittelt werden.

Nach Erfassung der Schmelzpunktkurve wird die Probe wiederholt mit der Rate von -20 °Cmin^{-1} eingefroren. Durch Kenntnis des Schmelzpunktes kann die Temperatur, bei der die Heizrate von $+10$ auf $+0.5 \text{ °C min}^{-1}$ herabgesetzt wird, näher an den Schmelzpunkt eingestellt werden, um die Messzeit zu verkürzen. Bei dieser neu ausgewählten Temperatur wird 5 min gewartet, bis auf eine Temperatur knapp oberhalb der Schmelztemperatur (maximal $\Delta T_m = 0.5 \text{ °C}$) mit der Rate $+0.5 \text{ °C min}^{-1}$ aufgeheizt wird.

Im Anschluss wird ohne Halten bei dieser Temperatur T_{Umkehr} die Probe mit der Rate von -0.5 °C min^{-1} auf eine maximal etwa $0.2\text{-}0.3 \text{ °C}$ unterhalb der Schmelztemperatur liegende Temperatur T_{Halten} abgekühlt, bei der ebenfalls 5 min angehalten wird. Der Gedanke dahinter ist, dass eisadsorbierende Moleküle an zuvor weit angeschmolzene und nun wieder wachsende Kristalle binden, was zu einer Erhöhung und damit erleichterten Detektion der Hysterese führen sollte. Nach dem Konstanthalten der Temperatur wird mit einer Rate von -0.5 °C min^{-1} abgekühlt, bis der Wärmestrom nach dem Gefriersignal die Basislinie erreicht.

Diese Prozedur kann mehrmals wiederholt werden mit Variation von T_{Umkehr} und/oder T_{Halten} sowie sämtlichen Haltezeiten.

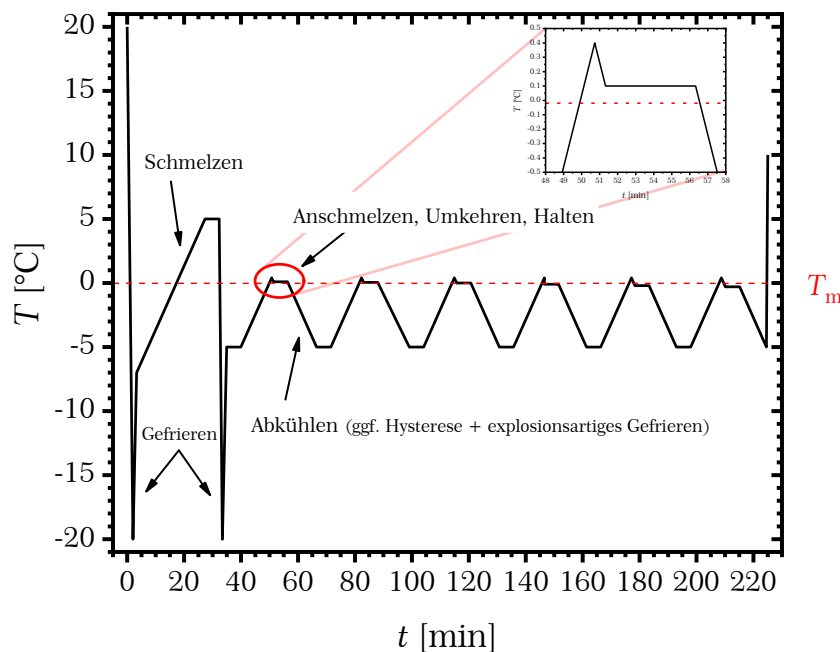


Abbildung A.4: Beispiel für ein Temperaturprofil einer TH-Messung am DSC mit den typischen Heiz- und Kühlraten von $\pm 0.5 \text{ °C min}^{-1}$ sowie Haltezeiten von 5 min. Die Haltetemperatur wird hier bei jedem Zyklus um 0.5 °C herabgesetzt, die Umkehrtemperatur nicht verändert, Die eingeklinkte Graphik zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der rot eingekreisten Phase des Anschmelzens und Haltens.

A.4.2. TH-Messung am Beispiel von AFGP 1-5

In **Abbildung A.5** ist eine DSC-TH-Messung am Beispiel einer Lösung mit 20 mg ml^{-1} AFGP 1-5 (aus *Dissostichus mawsoni*; antarktischer Seehecht; Aufreinigung: AG A. deVries, Universität Illinois, USA) dargestellt. Dabei wurde die Temperatur T_{Umkehr} bei jedem Zyklus beibehalten, während T_{Halten} um jeweils $0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ herunter gesetzt wurde. Die Wartezeit bei dieser Temperatur wurde ebenso nicht geändert und betrug jedes Mal 5 Minuten. Durch die Anwesenheit der Antigefrierproteine setzt das Gefrieren bei einer tieferen Temperatur ($\sim -1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) verglichen mit der Schmelztemperatur ($\sim 0 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ein. Dabei ist keine Abhängigkeit von der Haltetemperatur zu beobachten, die letztendlich den Eisanteil bestimmt. Diese Beobachtung weist auf den moderaten Charakter des AFGP 1-5 hin, da dessen Anlagerung an die Eiskristalle sehr schnell abläuft und somit nur eine geringe Abhängigkeit von der Größe der Eisphase besteht (Takamichi et al., 2007; Drori et al., 2014).

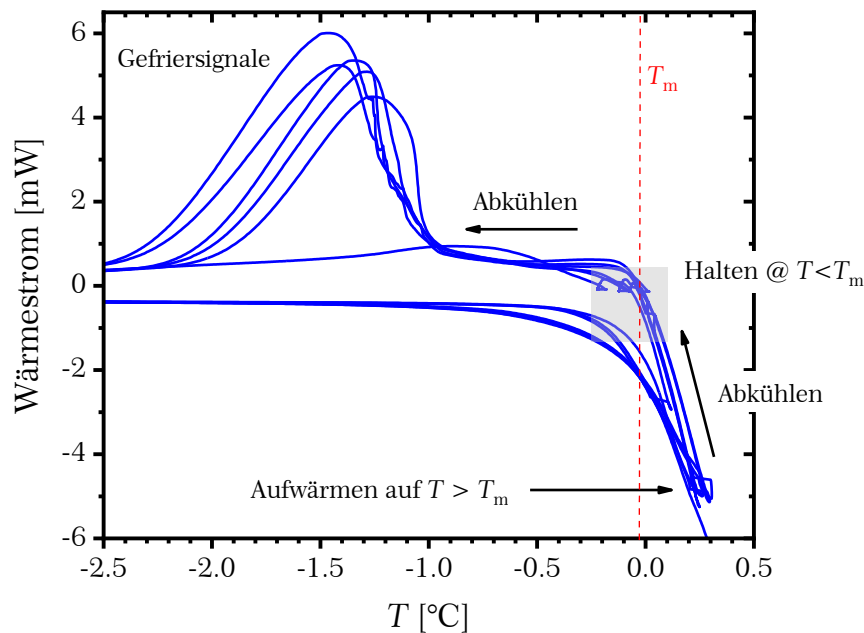


Abbildung A.5: Thermogramm einer TH-Messung am Beispiel von 20 mg ml^{-1} AFGP 1-5. Nach Erfassung der vollständigen Schmelzpunktkurve im ersten Zyklus wurde in den folgenden Zyklen auf $0.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$, was oberhalb der Schmelztemperatur von $\sim -0.02 \text{ }^{\circ}\text{C}$ liegt, aufgewärmt und anschließend auf eine Temperatur um den Schmelzpunkt herum abgekühlt. Bei dieser Temperatur (hier: $-0.2, -0.1, 0.0, +0.05, +0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$) wurde 5 min gehalten, bevor wieder gekühlt wurde. Bei $\sim -1.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gefriert die Probe bei jedem Zyklus, was eine TH von $\sim -1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ergibt.

Die Schmelztemperatur lässt sich genauer eingrenzen, wenn die Entwicklung des Wärmestroms während der Haltephase um den Schmelzpunkt herum betrachtet wird. In **Abbildung A.6** ist ein Ausschnitt aus den Thermogrammen in dem angesprochenen Bereich gezeigt. Wird bei einer Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur gehalten, steigt der Wärmestrom an bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur. Im Fall des Haltens bei $T_{\text{Halten}} < T_m$ verhält es sich umgekehrt. Die Temperatur sinkt bei gleichzeitigem Sinken des Wärmestroms. Die von der Probe

aufgenommene oder abgegebene Wärme aufgrund der während der Haltephasen stattfindenden Schmelz- oder Gefrierprozesse werden durch das DSC reguliert, wobei das Messgerät vermutlich übersteuert, sodass diese Änderungen in den Wärmestömen zu beobachten sind.

Der Schmelzpunkt in dem gezeigten Beispiel kann auf den Temperaturbereich zwischen -0.02 °C und $+0.01\text{ °C}$ eingegrenzt werden, was wesentlich genauer ist als die Erfassung über die Onset- oder Wendepunkttemperatur. Die Thermische Hysterese ergibt sich schließlich aus der Differenz der Schmelztemperatur und der Onsettemperatur des Gefriersignals. Das AFGP 1-5 weist bei einer Konzentration von 20 mg ml^{-1} demnach eine Hysterese von $\sim 1\text{ °C}$ auf.

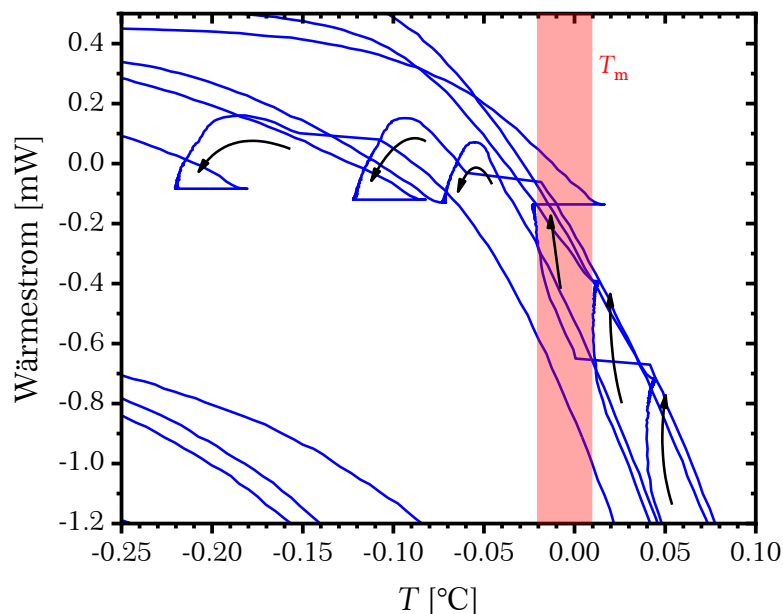


Abbildung A.6: Ausschnitt aus dem Thermogramm aus [Abbildung A.5](#), um die Bestimmung der Schmelztemperatur $T_m \sim -0.005 \pm 0.015\text{ °C}$ zu zeigen. Die Änderung des Wärmestroms und der Temperatur während der Haltezeit ist abhängig davon, ob sich das System unter- oder oberhalb von T_m befindet.

Anwendbar ist diese Methode prinzipiell auch für kleine Hysteresen im Bereich von 0.05 °C . Um in diesen Lösungen das zum Schmelzpunkt versetzte Gefrieren detektieren zu können, muss die Haltetemperatur allerdings auf den oder oberhalb des Schmelzpunktes gesetzt werden. Ein bedeutender Nachteil dieser Methode ist einerseits der größere Messaufwand, um die Schmelztemperatur genauer erfassen zu können, was bei den Messungen am Mikroskop bei einer einzigen Messung möglich ist. Außerdem kann die Probe nicht beobachtet werden, sodass keinerlei Informationen über mögliche, die Hysterese beeinflussende Ereignisse in der Probe vorliegen.

A.4.3. Probenpräparation

Wie in **Abbildung A.7a** zu sehen ist, erfolgt das Gefrieren in einer weit über dem Schmelzpunkt gehaltenen Probe (rot markierter Bereich) in reinem Wasser verzögert, was an der Kurvenform im blau markierten Bereich erkennbar ist und eine Thermische Hystereseaktivität vortäuschen würde. Es wurde vermutet, dass das Gefrieren in der vollständig geschmolzenen bulk-Probe durch einen am Rand verbliebenen Kristall, der in Kontakt mit dem unterkühlten Wasser kam, ausgelöst wurde. In einer weiteren Messung wurde die Probe ($5\ \mu\text{l}$) daher mit bis zu $7\ \mu\text{l}$ Squalen überschichtet, um eine Beeinflussung von möglicherweise beim Abkühlen an dem Deckel kondensiertem und anschließend gefrorenem Wasser auf das Gefrierverhalten der bulk-Lösung zu verhindern. Dem Thermogramm in **Abbildung A.7b** ist zu entnehmen, dass eine mit Squalen überschichtete Wasserprobe allerdings das gleiche Verhalten zeigt. Bei Messungen zur Erfassung der TH sollten daher Umkehrtemperaturen nahe am Schmelzpunkt gewählt werden. Dabei spielt die Präparation der Probe eine untergeordnete Rolle.

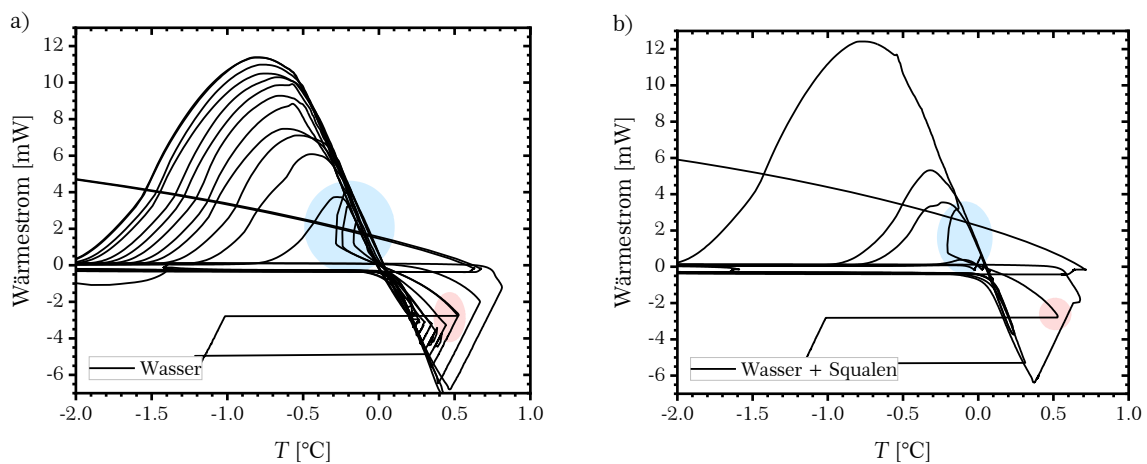


Abbildung A.7: Anwendung der TH-Messprozedur am DSC für eine reine Wasserprobe a) ohne und b) mit Ölbeschichtung. Bei beiden Probenpräparationen werden bei Wahl weiter vom Schmelzpunkt ($\Delta T_m = \sim +0.1\ \text{°C}$) entfernter Umkehrtemperaturen (rot markierter Bereich) verzögerte Gefrierereignisse erfasst, wie an der Kurvenform im blau markierten Bereich erkennbar ist.

A.4.4. TH-Messungen am DSC: IAP2 #C und MBP-TmAFP

Die DSC-Methode zur Erfassung einer Thermischen Hystereseaktivität wurde mit aufgereinigten Lösungen der Birkenpollen #C (**Abbildung A.8**) sowie mit dem hyperaktiven MBP-TmAFP (**Abbildung A.10**) durchgeführt.

A.4.4.1. BPWW #C

Das Muster der Gefriersignale der überstehenden Lösung des zweiten Aufreinigungszyklus (**Abbildung A.8a**), bei denen der starke Anstieg im Wärmestrom erst etwa $0.5\ \text{°C}$ unterhalb des Haltebereichs eintritt, ist nicht auf eine TH-Aktivität

zurückzuführen, sondern steht im Zusammenhang mit den die Viskosität der Lösung heraufsetzenden gelösten Substanzen ($T_m \sim -4.5 \text{ °C}$) und dem daraus folgenden verlangsamten Gefrierprozess. Diese Vermutung wird im Vergleich mit Messungen von konzentrierten Sucroslösungen (**Abbildung A.9**) bestätigt. Dabei ist bei der nicht überschichteten Sucroslösung (a)) zu beachten, dass zum Teil oberhalb des Schmelzpunktes ($\sim -1.7 \text{ °C}$) angehalten wurde, sodass das Gefrieren beim Abkühlen verzögert eintritt, da zunächst der Schmelzpunkt überschritten werden musste.

In einer von mehreren Messungen zeigt das Gefriersignal der mit Squalen beschichteten Probe (**Abbildung A.8b**) einen kleinen Ausschlag bei einer Temperatur ($\sim -3.3 \text{ °C}$) unterhalb der Onsetgefrieretemperatur ($\sim -2.2 \text{ °C}$). Dieses Ereignis als Hysterese eines einzelnen Eiskristalls in der gefrierenden Matrix zu deuten, erscheint dabei aufgrund des einmaligen Auftretens und der hohen Hysterese von $\sim 1 \text{ °C}$ als sehr unwahrscheinlich. Kryomikroskopmessungen mit derselben Probe zeigten ebenso keine Gefrierhysterese an, sondern langsames, kontinuierliches Wachstum des Eiskristalls. Daraus kann geschlossen werden, dass die Hystereseaktivität der eisbindenden Moleküle in dem Birkenpollenwaschwasser in einem sehr geringen Ausmaß vorhanden ist, sodass die Temperaturpräzision der hier verwendeten Messgeräte mit $\pm 0.05 \text{ °C}$ (DSC) oder $\pm 0.1 \text{ °C}$ (Kryomikroskop) nicht ausreichend ist, um diese zu erfassen. Möglicherweise ist die Konzentration der Moleküle in der aufgereinigten Lösung für eine messbare Hysterese zu gering, während für eine Strukturierung von Eiskristallen genügend Moleküle vorhanden sind.

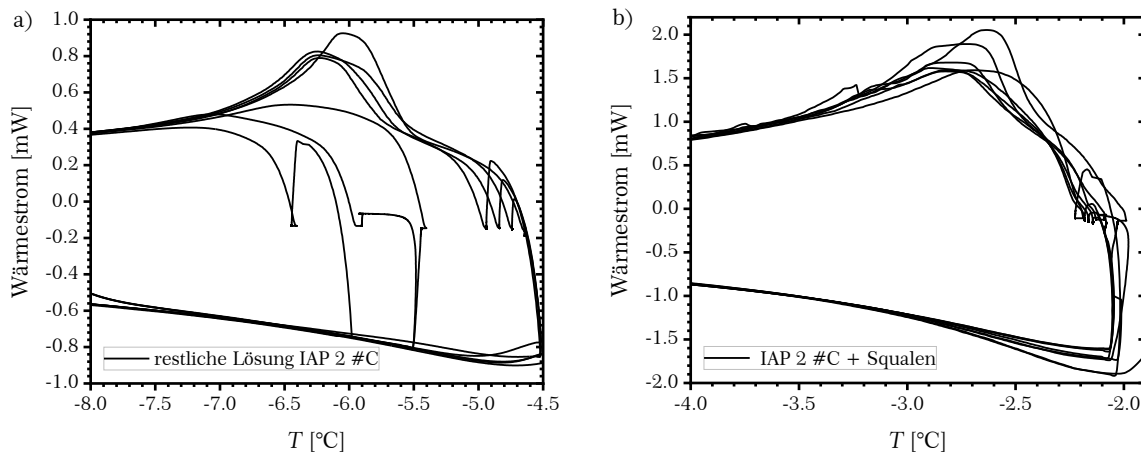


Abbildung A.8: Thermogramme von DSC-TH-Messungen an a) der bei dem zweiten Aufreinigungszyklus überstehenden Lösung des BPWW #C und b) der mit Squalen überschichteten IAP 2-Lösung. Das sich von einer TH-Messung mit Wasser unterscheidende Gefriermuster resultiert aus dem verlangsamten Kristallwachstum in der konzentrierten Probe, wie besonders in a) mit einem Schmelzpunkt von $\sim -4.5 \text{ °C}$ zu erkennen ist.

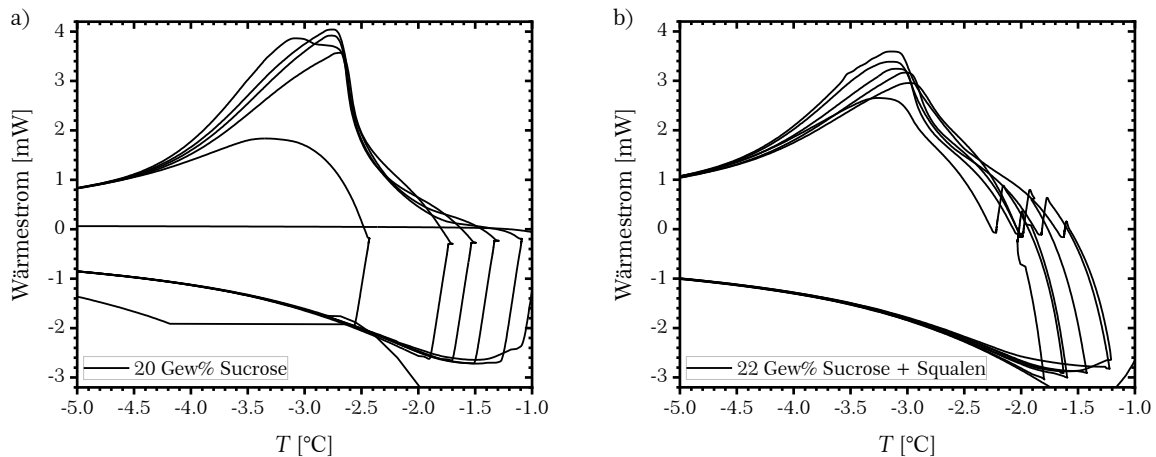


Abbildung A.9: TH-Referenzmessungen mit a) einer 20 Gew%-igen Sucroselösung und b) einer 22 Gew%-igen Sucroselösung mit Squalen überschichtet.

A.4.4.2. MBP-TmAFP

Der Versuch, die Thermische Hystereseaktivität von MBP-TmAFP mittels dynamischer Wärmestromkalorimetrie zu erfassen, war deutlich weniger erfolgreich als in der Literatur (Hansen, T. N. and Baust, J. G., 1988, 1989) für TmAFP mit TH-Werten von mehreren Grad beschrieben (**Abbildung A.10**).

Als TH-Werte bei einer Konzentration von 1.6 mg ml^{-1} wurden $0.2\text{-}0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ in PBSx1 (a)+b)) und $0.2\text{-}0.7 \text{ }^\circ\text{C}$ in Wasser (c)) gemessen, was geringere Aktivitäten sind als in der mikroskopischen Messmethode mit $(1.38 \pm 0.70) \text{ }^\circ\text{C}$ (**Tabelle 3.11**) erhalten wurde. Eine genauere Bestimmung der Thermischen Hysterese aus den DSC-Experimenten setzt mehr Messreihen zur exakteren Erfassung der Schmelztemperatur T_m voraus.

Eine Denaturierung des Proteins durch den Kontakt mit dem Öl Squalen oder durch die wiederholten Abkühl- und Heizzyklen könnte die geringe Aktivität erklären. Allerdings wurde keine kontinuierliche Verschlechterung der TH-Aktivität mit zunehmender Anzahl an Einfrierprozessen beobachtet, da die TH-Werte keinem Muster folgen. Auch bei der Messung ohne Squalen zur Beschichtung (c)) wurden keine höheren TH-Werte gemessen, sodass nicht das Öl als Grund für eine mögliche Denaturierung herangezogen werden kann.

In den Publikationen von Hansen und Baust (1988), Lu et al. (2002) und Yu et al. (2010) nimmt die TH-Aktivität der untersuchten AFPs mit sinkendem Eisanteil in der Probe zu, was mit höheren Halte- und Umkehrtemperaturen erreicht wurde, da dadurch den Proteinen eine geringere Gesamtoberfläche an Eis gegenübersteht. Besonders bei den langsam akkumulierenden hyperaktiven Proteinen wie dem TmAFP macht sich diese Abhängigkeit der Th von der Kristallgröße bzw. Gesamteisfläche bemerkbar.

Diese in der Literatur erwähnten Beeinflussungen der TH-Aktivität durch die Umkehr- und Haltetemperaturen können hier am Beispiel des TmAFP jedoch nicht bestätigt werden. Die gleiche Umkehrtemperatur ergibt bei verschiedenen

Haltetemperaturen die gleiche Gefriertemperatur (a), in PBSx1) und eine höhere Umkehrtemperatur ergibt eine höhere Gefriertemperatur und damit geringere TH-Aktivität.

Diese Methode zur TH-Erfassung eignet sich daher weniger zur quantitativen Charakterisierung der TH-Aktivität von hyperaktiven AF(G)Ps, sondern dient lediglich der qualitativen Untersuchung auf vorhandene Hystereseaktivität.

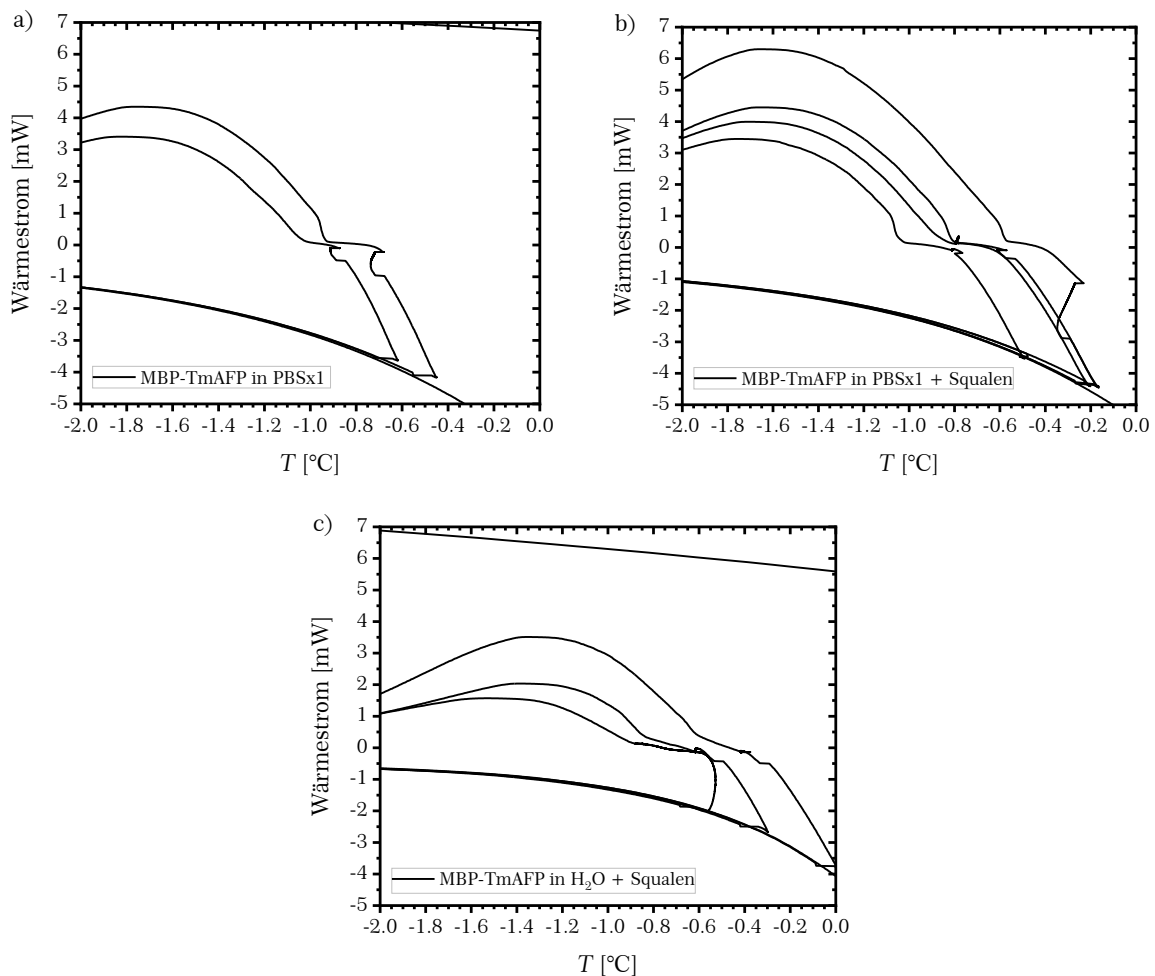


Abbildung A.10: DSC-Thermogramme von Hysteresemessungen mit MBP-TmAFP a) in PBSx1 (1.6 mg ml^{-1}), b) in Wasser (1.4 mg ml^{-1}), jeweils mit Squalen überschichtet, und c) in PBSx1 (1.6 mg ml^{-1}) ohne Squalenbeschichtung. Die eindeutig vorhandene Hystereseaktivität kann nicht quantitativ beschrieben werden, weil in einem Experiment verschiedene Gefriertemperaturen auftreten, die keine logische Korrelation mit den Umkehr- und Haltetemperaturen zeigen.

A.5. Modifizierte Eisaffinitätsaufreinigung am Rotationsverdampfer

Analog zu der von Kuiper et al. (2003) entwickelten Methode zur spezifischen Extraktion von eisbindenden Molekülen aus einer Lösung über einen Kühlfinger, die auch in dieser Arbeit angewendet wurde (Eisaffinitätsaufreinigung; IAP); **Kapitel 2.4.1**), haben Marshall et al. (2016) eine weitere auf Eisadsorption beruhende Aufreinigungsmethode ausgearbeitet, die mit weniger Volumen auskommt und bei einer geringeren Zeitinvestition eine höhere Effizienz bezüglich Reinheit und Ausbeute aufweist.

Bei dieser sogenannten **ice shell purification (ISP; Eisfilmaufreinigung)** wird ein klassischer Rundkolben an einen Rotationsverdampfer gehängt und nach Überziehen der Kolbeninnenwand mit einer dünnen Eisschicht und Zugabe der aufzureinigenden Lösung wird der Kolben in einem Kältebad gedreht, wodurch den eisbindenden Molekülen eine große Oberfläche zur Verfügung steht und die nicht eisbindenden Moleküle durch die stetige Rotation weggespült werden.

Es gab später Andeutungen, dass sich diese Methode nur für hyperaktive Antifrierermoleküle eignet (Davies, 2017). Es wurde vermutet, dass das auf der Kolbeninnenwand anfrirende Eis mit eben der basalen Kristallfläche in das Kolbeninnere bzw. in Richtung der Lösung hin wächst, sodass eben nur hyperaktive Proteine an das Eis adsorbieren. Auch in dieser Arbeit wurde diese Beobachtung an einer in Anlehnung an diese Idee eingerichteten Rotationsvorrichtung an den Beispielen AFGP 8 und Safranin T gemacht, welche beide moderate Antifrierer-substanzen sind. Anschließende Eisstrukturierungsmessungen (Daten nicht gezeigt) wiesen auf eine nicht mehr oder nur noch mäßig vorhandene Eisstrukturierungsaktivität in den aufgereinigten Lösungen hin, während die überstehende Lösung eine eindeutige Aktivität zeigte. Dabei wurde durch Ausfrieren von etwa der Hälfte des ursprünglich eingesetzten Volumens eine vergleichbare Konzentration gewährleistet.

Aus einem Aufreinigungsexperiment am Kühlfinger ergab sich eine generelle Nichtanwendbarkeit dieser Aufreinigungsmethoden für das aus Clustern bestehende Safranin. Möglicherweise spielt dabei ein Gleichgewicht zwischen den Safraninclustern und der Lösung eine Rolle: trennen sich Safraninmoleküle von dem adsorbierten Safranincluster ab, ist die Anzahl an letztendlich im Eis eingeschlossenen Molekülen deutlich geringer, sodass in der Eisfraktion keine Antifriereraktivität mehr beobachtbar ist.

A.5.1. Messaufbau für ISP

Der in dieser Arbeit angewandte Messaufbau zur Eisaureinigung an einem rotierenden System (**IKA RV 10**) sowie die sich bewährte Vorgehensweise wird im Folgenden kurz beschrieben.

Zunächst werden bei einer Rundkolbengröße von 50 oder 100 ml 1-2 ml bidestilliertes Wasser unter stetigem Rühren des Kolbens in flüssigem Stickstoff an der inneren Kolbenwand als Impfeis angefroren (**Abbildung A.11a**). Durch Austausch des Stickstoffgefäßes gegen ein mit einem externen Thermostaten (**HAAKE F3**) auf Temperaturen knapp unterhalb des Schmelzpunktes temperierbares Gefäß, das mit einer Glykol-Wassermischung gefüllt ist, wird der Kolben mit dem Impfeis auf eine eingestellte Temperatur gebracht. Dabei sollte das Impfeis lange genug temperiert werden, um ein Gefrieren der anschließend zuzugebenden Lösung zu vermeiden. Die Zugabe der auf Eis gekühlten, aufzureinigenden Lösung (10-20 ml) geschieht mit einer langen 10- oder 20 ml-Messpipette über den auf den Kolben gerichteten Zugang (**Abbildung A.11b**) bei ständigem Rotieren. Die Zugabe sollte in kleinen Schritten erfolgen, damit das Impfeis nicht durch die etwas wärmere Lösung schmilzt und eine Temperaturangleichung stattfinden kann.

Nach vollständiger Zugabe der Probelösung wird der Kolben mehrere Minuten bis wenige Stunden weiter gedreht, während die Temperatur des Temperierbades konstant gehalten wird oder minimal um $\sim \pm 0.2$ °C gemäß der Wachstumsgeschwindigkeit des Eises geändert wird. Nach dem Ausfrieren von etwa dem halben Volumen der Lösung wird die überstehende Lösung entfernt und das angewachsene Eis mit wenig kaltem Wasser ausgespült. Die Eisfraktion wird anschließend aufgeschmolzen und kann für folgende Experimente verwendet werden.



Abbildung A.11: Darstellungen der drei Schritte bei der Eisfilmaufreinigung (ISP). a) Durch Rotieren eines mit wenigen Millilitern Wasser gefüllten Kolbens in flüssigem Stickstoff friert eine dünne Eisschicht an der inneren Kolbenwand an. b) Anschließend wird der Kolben mit dem Impfeis in einem mit einem externen Kühlbad temperierten Vorratsgefäß, das selbst mit einer Kühlflüssigkeit gefüllt ist, gerührt. Die Zugabe der aufzureinigenden Lösung erfolgt über den anhängenden Kühler mit einer längeren Messpipette (unten rechts).

A.6. Größenverteilung der DSC-Emulsionströpfchen

Die Präparation der wässrigen Emulsionströpfchen in einer Ölphase aus Methylcyclohexan und Methylcyclopentan (1:1 (v:v)) mit dem neutralen Emulgator Span65® (Sorbitantristearat; 7 Gew%) durch zehninütiges Rühren bei 20 000 UpM ergibt eine Tropfengrößenverteilung zwischen 1-10 μm , wie aus der in **Abbildung A.12** gezeigten Häufigkeitsverteilung abgelesen werden kann. Kleinere Tröpfchen können dabei aufgrund der beschränkten Auflösung des zur optischen Erfassung der Tropfen verwendeten Lichtmikroskops nicht erfasst werden (**Abbildung A.13**). Die Auswertung der Größenstatistik erfolgte manuell über das frei verfügbare Programm ScionImage (ScionCorp, 2008).

Für die detektierbaren Tröpfchen ergibt sich aus einer Anpassung mit einer logarithmischen Normalverteilung (**A.3**) ein Mittelwert der Durchmesser d von 2.1 μm mit einer Standardabweichung von 2.4 μm bzw. ein Maximum bei 1.7 μm (s. auch **Tabelle A.3**).

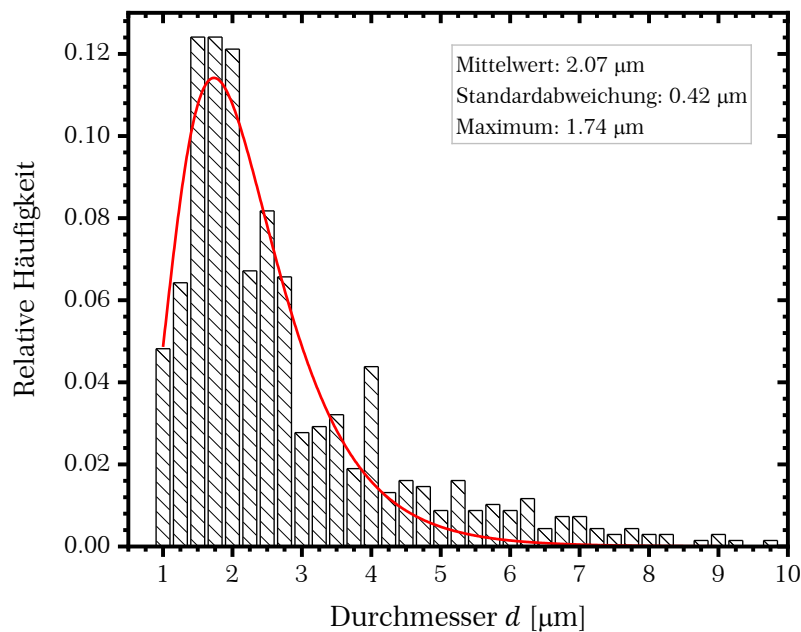


Abbildung A.12: Häufigkeitsverteilung der Tropfengrößen in einer typischen DSC-Emulsion. Die Größe der meisten Tropfen liegt zwischen 1 und 3 μm . Zur statistischen Analyse wurde eine logNorm-Verteilung (rote Linie) verwendet. Zu beachten ist die auf minimal 1 μm begrenzte Auflösung des Mikroskops. Insgesamt wurden 687 Tropfen ausgewertet.

$$f(d) = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi} \cdot wd} \cdot \exp\left(\frac{-\ln\left[\frac{d}{x_c}\right]^2}{2w^2}\right) \quad (\text{A.3})$$

Tabelle A.3: Parameter für die logNormalverteilung (A.3) zur Analyse der Häufigkeitsverteilung der DSC-Emulsionströpfchen. der Mittelwert wird durch x_c angegeben, w ist dabei die Standardabweichung. A gibt die Fläche unter der Kurve an.

A	y_0	w	x_c [μm]
0.228 ± 0.012	0 (gesetzt)	0.421 ± 0.026	2.069 ± 0.053

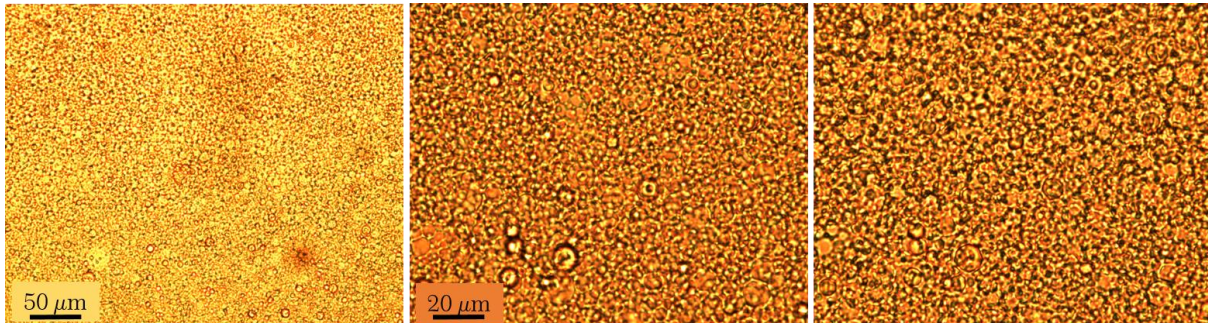


Abbildung A.13: Mikroskopaufnahmen der DSC-Emulsionstropfen bei einer Vergrößerung von 20 x (links) sowie 50 x (Mitte und rechts).

A.7. Absorptionsbanden sämtlicher Spektren und deren Zuordnung

A.7.1. UV-VIS von BPWW und IAP

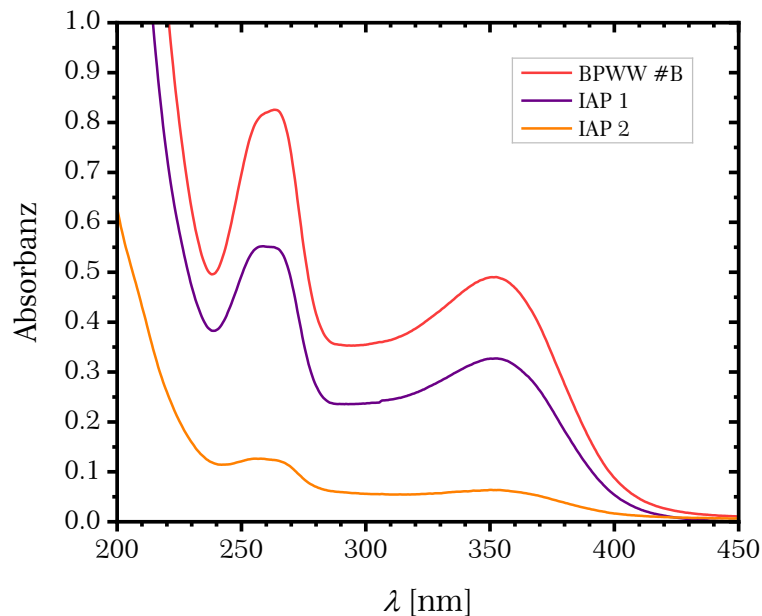


Abbildung A.14: UV-VIS-Spektren der BPWW #B-Lösung (rot) sowie der aufgereinigten Fraktionen des ersten (violett) und zweiten (orange) Zyklus der Eisaffinitätsaufreinigung. Das Absorptionsmaximum bei 353 nm ist auf den farbgebenden Farbstoff zurückzuführen, das Signal bei 260 nm könnte von aromatischen Gruppen in DNA-Molekülen mit Überlagerung von Proteinbanden bei 280 nm stammen.

Tabelle A.4: Das Verhältnis der Absorbanzen bei den beiden Absorptionsmaxima von 260 und 353 nm verschiedener BPWW #B-Fractionen aus der Eisaffinitätsaufreinigung ändert sich nicht durch den Aufreinigungsprozess.

Probe	$\frac{A_{260\text{nm}}}{A_{353\text{nm}}}$
BPWW #B	1.677
Rest 1	2.070
IAP 1	1.685
Rest 2	1.672
IAP 2	1.975

A.7.2. IR-Spektren von BPWW

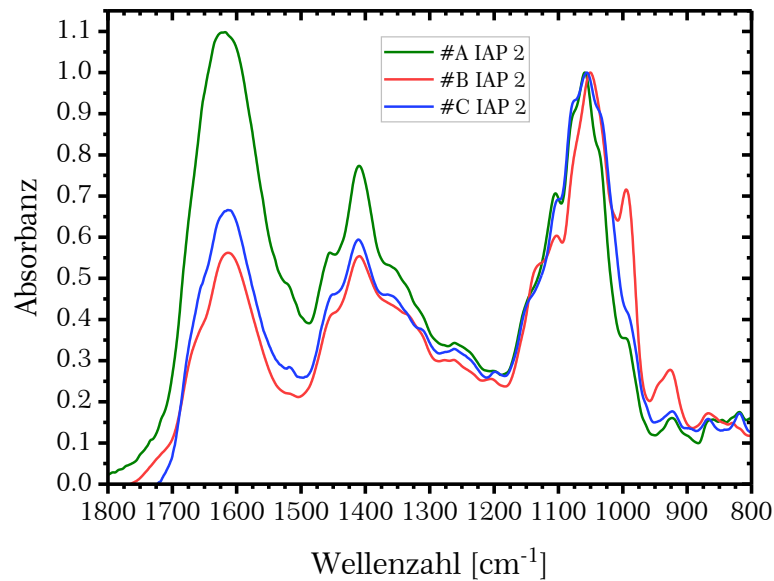


Abbildung A.15: IR-Spektren der aufgereinigten Proben IAP 2 der drei in dieser Arbeit untersuchten Birkenpollenlieferungen, deren Bandenmuster sehr ähnlich sind. Im für Zucker charakteristischen Bereich zwischen 1200 und 900 cm^{-1} unterscheidet sich das Spektrum der einen Eiskeim aufweisenden Pollen #B (rot) etwas von dem der beiden anderen Pollen #A (grün) und #C (blau), die jeweils zwei Eiskeime enthalten.

Tabelle A.5: Absorptionsbanden in Wellenzahlen (cm^{-1}) der in den [Abbildung 3.14](#), [Abbildung 3.20](#) und [Abbildung A.15](#) gezeigten IR-Spektren von Birkenpollenwaschwasser sowie Erlen- und Kieferpollenwaschwasser mit der möglichen Bandenzuordnung. Intensive Banden sind fett markiert.

BPWW #A	BPWW #B	Kiefer	BPWW #C	Erle	Zuordnung
	1663	1663	1663	1663	Wasser?
1617	1614	1608	1614	1615	Carboxylat-Valenz (antisymmetr.)
1456	1451	1451	1451	1451	C-H-Deformation
1410	1409	1409	1409	1412	Carboxylat-Valenz (symmetr.)
1359	1364	1330	1364	1357	C-H-Deformation
1260	1274	1270	1263	1260	"
1144	1135	1135	1135	1135	C-O-Valenz
1104	1105	1105	1104	1104	"
1077	1077	1077	1077	1077	"
1059	1049	1049	1053	1053	"
1036			1032	1032	"
994	993	996	997	997	"
925	924	924	924	924	Deformation unges./aromat. C-H
864	868	868	868	868	"
819	830	830	818	818	"

Tabelle A.6: IR-Schwingungsbanden in cm^{-1} der Referenzsubstanzen aus **Abbildung 3.15** im Vergleich mit BPWW #B. Die intensivsten Banden in einem Spektrum sind fett markiert. Die mögliche Zuordnung bezieht sich auf diese fett markierten Banden, kann aber auch für die anderen in der Zeile korrekt sein.

BPWW #B	BPWW #B pH2	Hyaluronat	Hyaluronsäure	Heparin	Alginate	AFP III	Cellulose	Dextran	Zuordnung
	1732	1743							Carbonsäure
1663	1659	1663	1654			1643			Amid-I//Wasser
1614	1614		1615	1620	1605				Carboxylat (antisymmetr.)
		1559	1558						Amid
	1512					1516			Amid-II
1451	1450					1447		1459	C-H-Deformation
1409	1415	1418	1407	1420	1410				Carboxylat (symmetr.)
							1429	1415	
1364	1363	1369	1378			1390	1366	1356	C-H-Deformation
							1333		
1309		1315	1322				1316		
1274						1292	1281	1273	
	1235			1231		1231			R-SO ₄
1205	1207	1212	1203				1203	1203	
		1154	1150	1150	1169		1162	1152	C-O-Valenz
1135	1130				1121				"
1105	1102						1109	1103	"
1077	1067	1075	1075		1081			1073	"
1049	1048	1043	1043	1032	1029		1058		"
							1034	1034	"
								1015	"
993	996			1001			984		"
	943		945	945	948				Def. unges./aromat. C-H
924	926	928						917	"
		892	896	892	888		895		"
868	865								"
830				816	819			847	"

Tabelle A.7: IR-Absorptionsbanden in Wellenzahlen (cm^{-1}) der in **Abbildung 3.29** und **Abbildung A.18** gezeigten Spektren von *M. alpina* und Referenzsubstanzen mit der möglichen Bandenzuordnung. Intensive Banden sind fett markiert. Die mit 'Überstand' bzw. 'Filtrat' bezeichneten Lösungen entstammen den 100 kDa-Zentrifugenfilterexperimenten.

Stamm-lösung	IAP 2016	IAP 2017	PDA 2016	PDA 2018	Überstand 2016	Überstand 2017	Filtrat 2016	Filtrat 2017	Glycerin	Zuordnung (u.a.)
	1719	1719								Carbonsäure
1650	1650	1650			1647		1650	1667		Amid-I/H₂O
1638			1638	1638		1636	1634	1634		Amid-I
1600	1600	1600	1600	1600			1598	1590-1562		Carboxylat
1550					1541	1532				Amid-II
					1516	1516				Amid-II
1453	1453	1453	1453	1453	1449		1453	1453	1455	C-H-Def.
			1416	1416		1412			1417	"
1400	1400	1400					1400	1400		Carboxylat/ C-H
					1389					C-H-Def.
	1349	1349	1363	1363						?
		1317							1340-1320	?
1233	1248	1248			1236	1236	1233	1233	1240-1200	C-O/S-O
		1142	1149	1149	1153					C-O
1120	1120	1120								"
			1102	1102						"
								1111	1111	"
	1097	1097								"
1077	1077	1077	1075	1073	1075		1073	1073		"
1050-1038			1037		1037	1037	1047-1038	1033	1039	"
				1020						"
			988	988					996	"
					972			974	972	unges. C-H/ aromat. C-H
	943	943		942						"
931			931				927	926	925	"
	889	889	896	896						"
872		863					865	872	860-850	"
	828	828								"

A.7.3. IR und UV-VIS von TmAFP

Die Proteine TmAFP und MBP-TmAFP weisen wie erwartet im IR-Spektrum (**Abbildung A.16**) die typischen Amid-I- und Amid-II-Banden bei 1650 und 1540 cm^{-1} auf (**Tabelle A.8**). Die im Spektrum des TmAFP (schwarz) prägnante Bande in Form eines Dreiecks bei 1116 cm^{-1} resultiert aus einer Phosphorylierung des Proteins, die während der Synthese im *E. coli*-Modellorganismus stattgefunden haben muss (Kottke, 2018). Besonders die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin sind von dem Anknüpfen einer Phosphatgruppe betroffen, wodurch das Protein zusätzliche negative Oberflächenladungen bekommt (Müller-Esterl, 2004). Aufgrund des geringen Anteils von TmAFP an dem großen Protein MBP-TmAFP ist diese Bande, falls in jenem Protein ebenfalls eine Phosphorylierung vorliegt, in dessen Spektrum (rot) nicht erkennbar. Eine signifikante Überlagerung der Protein-Phosphat-Bande mit der

Phosphat-Puffer-Bande bei 1063 cm^{-1} (grau) kann ausgeschlossen werden, da in dem TmAFP-Spektrum die beiden weiteren Pufferbanden bei 982 cm^{-1} und 852 cm^{-1} nicht detektierbar sind.

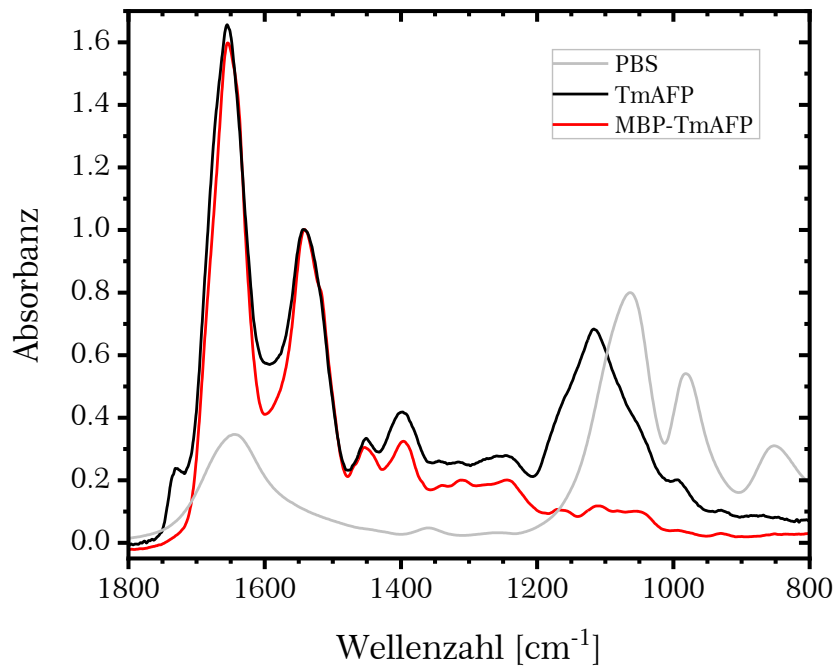


Abbildung A.16: IR-Spektren von TmAFP (schwarz) und MBP-TmAFP (rot) aus dem PBS-Puffer (grau) zu Wasser umgepuffert. Neben den Proteinbanden bei 1654 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} ist die im TmAFP-Spektrum detektierbare Bande bei 1116 cm^{-1} interessant, die mit einer Phosphorylierung des Proteins zusammenhängt.

Tabelle A.8: Absorptionsbanden (in cm^{-1}) der IR-Spektren von (MBP)-TmAFP und dem Phosphat-haltigen PBS-Puffer mit Zuordnung, die im Fall des Puffers über eine Gaussian-Rechnung erfolgte (Dreischmeier, K. and Drewel, A.-K., WiSe 2009/2010).

(MBP-)TmAFP	Zuordnung	Puffer	Zuordnung
1730	Carbonsäure (TmAFP)		
1654	C=O-Valenz (Amid I)	1645	OH-Deformation von Wasser
1540	C-N-Valenz + N-H-Deformation (Amid II)	1063	OH-Deformation + P=O-Valenz
1453	C-H-Deformation (Proteingerüst)	982	"
1398	C-H-Deformation (Proteingerüst)	852	"
1240			
1116	Phosphat auf der Proteinoberfläche (TmAFP)		

Da die Konzentrationen der TmAFP- und MBP-TmAFP-Lösungen in PBS bekannt sind, kann über klassische UV-VIS-Spektroskopie mithilfe der Lambert-Beer-

Gleichung (2.49) auf deren Konzentrationen in den umgepufferten Lösungen geschlossen werden. Es werden für das proteincharakteristische Absorptionsmaximum bei 280 nm deren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} in PBS erhalten (s. Tabelle A.9). **Abbildung A.17** zeigt die Spektren der Stammlösungen in PBS mit Wasser als Referenz.

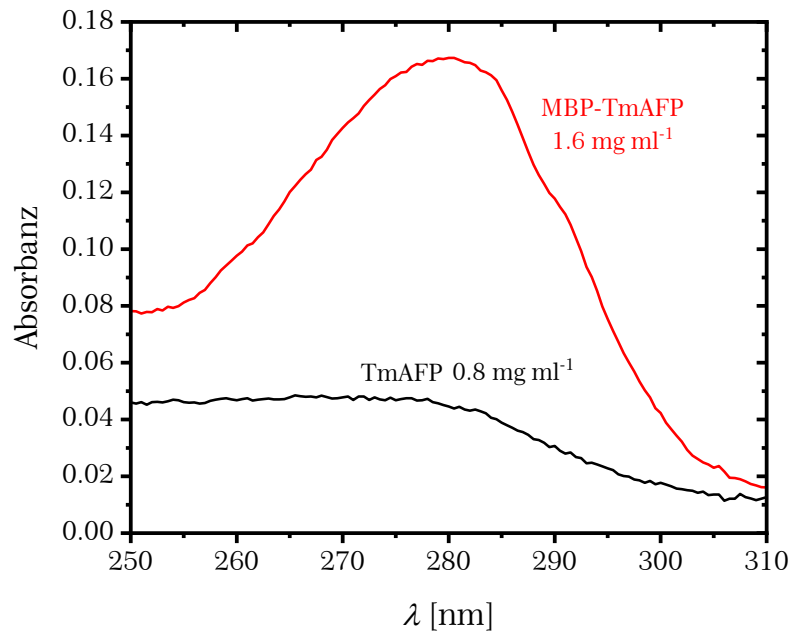


Abbildung A.17: UV-VIS-Spektren der Stammlösungen in PBS von TmAFP (schwarz; 0.8 mg ml⁻¹) und MBP-TmAFP (rot; 1.6 mg ml⁻¹).

Die Konzentration des TmAFP in der Sucroselösung, die durch Zugabe von fester Sucrose zu der vermessenen wässrigen Lösung (0.538 mg ml⁻¹) angesetzt wurde, wurde über **Gleichung (A.4)** aus der Dichte ρ_{Sucrose} einer 45 Gew%-igen Sucroselösung (1.202 g ml⁻¹) errechnet (**Tabelle A.9**). Die Absorbanzen der umgepufferten MBP-TmAFP-Lösungen wurden direkt in 45 Gew%-igen Sucroselösungen gemessen.

Tabelle A.9: Die bekannten Konzentrationen der (MBP-)TmAFP-Lösungen im PBS-Puffer lassen den Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} bei der Wellenlänge 280 nm über **Gleichung (2.49)** berechnen. Die gemessenen Absorbanzen A_{280} nach der Umpufferung ergeben die Konzentrationen in der 45 Gew%-Sucroselösung, die für die IRI-Messungen eingesetzt wurden.

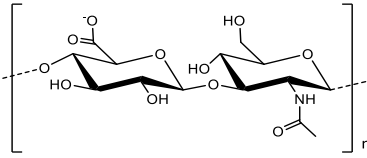
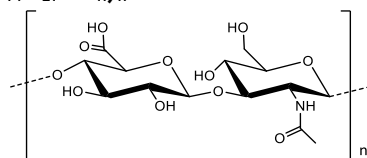
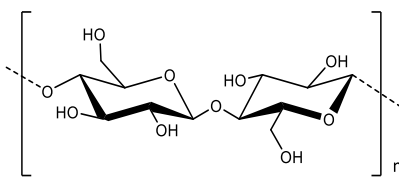
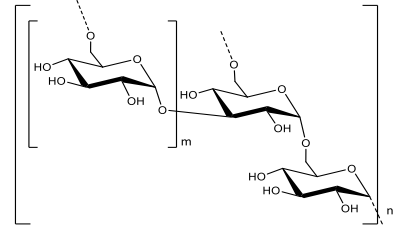
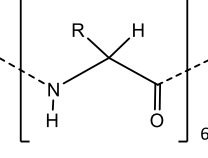
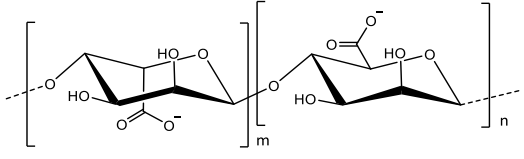
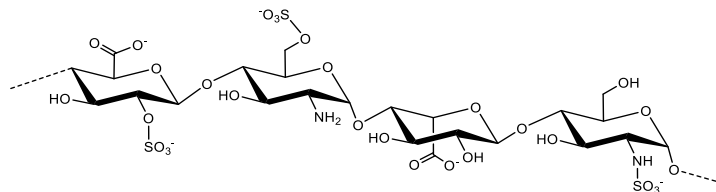
	TmAFP	MBP-TmAFP (§)	MBP-TmAFP (#)
ϵ_{280} [ml mg ⁻¹ mm ⁻¹]	0.056	0.105	0.105
c (in 45 Gew.% Sucroselösung) [mg ml ⁻¹]	0.358	1.388	1.120

Über eine Anpassungsfunktion an Literaturdaten (Lide, 2005) wurde folgende Gleichung zur Berechnung der Dichte einer 45 Gew%-igen Sucroselösung in Abhängigkeit vom Massenbruch w_2 erhalten.

$$\rho_{\text{Sucrose}}(w_2) [\text{g ml}^{-1}] = 0.55277 \cdot \exp\left(\frac{w_2}{1.43114}\right) + 0.44539 \quad (\text{A.4})$$

A.8. Chemische Strukturen der Referenzsubstanzen

Tabelle A.10: Chemische Formeln und Strukturen der zur Analyse der IR-Spektren des Birkenpollenwaschwassers herangezogenen Referenzsubstanzen aus **Abbildung 3.15**. Tabelle entnommen aus Dreischmeier et al. (2017).

Name	Chemische Summenformel und Struktur	
Hyaluronat (Natriumsalz)	$(C_{14}H_{20}NO_{11})_n$ 	Angesäuert: Hyaluronsäure $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$ 
Cellulose	$(C_{12}H_{20}O_{10})_n$ 	
Dextran	$(C_6H_{10}O_5)_m$ (verzweigtes Polymer) 	
AFP III (PDB-ID: 1hg7)	Protein (Aminosäuresequenz: http://www.rcsb.org) 	
Alginat (Natriumsalz)	$(C_6H_7O_6)_m(C_6H_7O_6)_n$ 	
Heparin (Natriumsalz)	Glycosaminoglycan mit den Wiederholungseinheiten D-Glucosamin und D-Glucuronsäure oder L-Iduronsäure; viele Hydroxyl- und Aminogruppen sind sulfatiert 	

A.9. Weitere Analytik an BPWW

Zusätzliche, aber weniger aussagekräftige oder weniger interpretierbare Experimente zur Analytik der Birkenpollenmakromoleküle, die jedoch eine Erwähnung wert sind, werden hier dargelegt.

A.9.1. Erhitzen des BPWW

Eine Untersuchung des Einflusses einer Wärmebehandlung auf die Eisnukleationsaktivität einer BPWW-Probe gab auf den ersten Blick widersprüchliche Ergebnisse (**Abbildung 3.46**): Während das dreistündige Erhitzen einer verdünnten Lösung des BPWW #C ("1"; dunkelblau; durchgezogene Linie) bei +90 °C die Aktivität der Eisnukleatoren fast vollständig auslöscht (dunkelblau; gestrichelte Linie), wird die Eisnukleationsaktivität einer um den Faktor 10^3 konzentrierteren, für drei Stunden bei +90 °C gerührten und anschließend in derselben Verdünnung wie Lösung "1" im DSC vermessenen Lösung (hellblau/"2"; durchgezogene Linie) nur mäßig reduziert (hellblau; gestrichelte Linie). Dabei wurde darauf geachtet, dass sich während des Erhitzens die Wassermenge in der Lösung nicht bzw. nur vernachlässigbar verändert, um Konzentrationsunterschiede zu vermeiden.

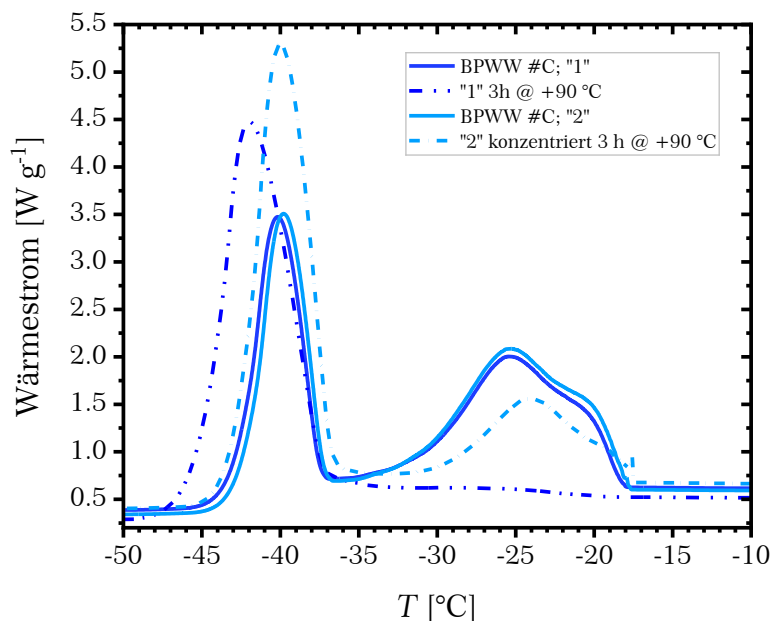


Abbildung 3.46: DSC-Messungen zur Untersuchung des Einflusses von Wärme (+90 °C) auf die Eisnukleationsaktivität von BPWW #C in Abhängigkeit von der Konzentration der erhitzten Probe. Wird eine verdünnte Lösung für drei Stunden erhitzt, ist die Eisnukleationsaktivität fast vollständig entfernt (dunkelblau). Dagegen wird die INA nur mäßig vermindert, wenn eine konzentrierte und für die Messung verdünnte Probe vermessen wird (hellblau).

Dieses Verhalten könnte im Zusammenhang mit der Bildung größerer und damit stabilerer Cluster bei höheren Konzentrationen stehen, sodass die Eisnukleationsaktivität weniger stark beeinträchtigt wurde als in der erhitzten verdünnten Lösung mit weniger stabilen Clustern. Allerdings wären dann

unterschiedliche Eisnukleationstemperaturen für verschiedene Konzentrationen zu erwarten. Die Beobachtung einer deutlich höheren Temperaturresistenz von Pummer et al. (2012) könnte in dem Phasenzustand der erhitzten Probe begründet liegen: Die Eisnukleation in einer BPWW-Lösung, die zur Trockene eingengt und anschließend wieder mit Wasser aufgenommen wurde, besteht noch bei +112 °C und wird erst bei Temperaturen oberhalb von +142 °C reduziert, bis bei +202 °C keine heterogene Nukleation mehr beobachtet wird. Der entscheidende Punkt könnte hierbei der wahrscheinlich glasartige Zustand der Lösung beim Eintrocknen sein, in dem die Probe eine wesentlich höhere Stabilität aufweist als in wässriger Lösung. Die von Pummer et al. (2012) aufgestellte Vermutung, dass es sich aufgrund der hohen Hitzeresistenz nicht um Proteine, sondern eher um Polysaccharide handelt, muss durch die in dieser Arbeit beobachtete Labilität bei +90 °C nicht entkräftet sein. Denkbar wäre eine unumkehrbare Zerstörung der Tertiärstruktur des Polysaccharids oder ein irreversibles Zerfallen der für die Eisnukleationsaktivität benötigten Aggregation durch die Wärmezufuhr.

A.9.2. Gelierungsexperiment mit CaCl₂

In einem weiteren Experiment von L. Wiehemeier wurde die aus den IR-Spektren (**Kapitel 3.1.3**) abgeleitete anionische Polymer-Struktur der eisbindenden Moleküle bekräftigt (Wiehemeier, 2015). Dazu wurde eine aufgereinigte IAP 2-Lösung des BPWW #C mit einer Calciumchlorid (CaCl₂)-Lösung versetzt (**Abbildung 3.47**). Die einsetzende Flöckenbildung (mittleres Bild) resultiert aus der Wechselwirkung der zweifach geladenen Ca²⁺-Ionen mit den anionischen Gruppen des Polymers, die zu der Ausbildung eines Gelnetzwerkes führt. Das gleiche Verhalten zeigt sich in einer mit einer CaCl₂-Lösung versetzten Alginatlösung (Bild rechts).

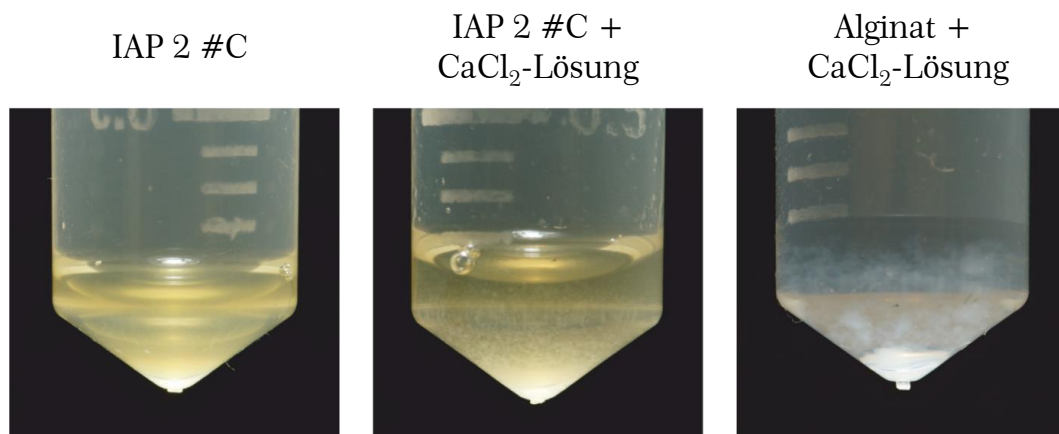


Abbildung 3.47: Im Gelierungsexperiment der aufgereinigten Birkenpollen-Probe IAP 2 #C mit einer CaCl₂-Lösung bilden sich Flöckchen (Mitte), womit anionische Polymere nachgewiesen sind. Als Vergleich eine mit einer CaCl₂-Lösung versetzte Alginatlösung (rechts). Abbildung mit Überarbeitungen entnommen aus Dreischmeier et al. (2017).

A.9.3. Gelelektrophorese für Zuckermoleküle (FACE)

Eine mit der aufgereinigten IAP 2-Lösung #B durchgeführte, für Proteine standardisierte Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung bzw. zur Erfassung der Molaren Masse der eisbindenden Moleküle war nicht erfolgreich. Es wurde lediglich eine Bande im Sammelgel nach der Silberfärbung detektiert, was aufgrund der nicht erfolgten Wanderung in dem Laufgel auf deren nicht proteinösen Charakter hindeuten könnte. Stattdessen wurde eine von Goubet et al. (2011) für Polysaccharide entwickelte und von L. Wiehemeier abgewandelte Gelelektrophorese (FACE) angewendet (Wiehemeier, 2015).

Dabei sind sowohl in der einmal aufgereinigten Lösung (IAP 1) als auch in der Waschwasserprobe (WW) der Birkenpollen #C mindestens drei Polysaccharide zu detektieren, von denen das kleinste Molekül bzw. das mit dem höchsten Ladungs-zu-Masse-Verhältnis am höchsten konzentriert ist (**Abbildung 3.48**). Dieses stimmt mit der Vermutung überein, dass das kleine eisadsorbierende Molekül deutlich höher konzentriert vorliegt als die beiden größeren Eisnukleatoren.

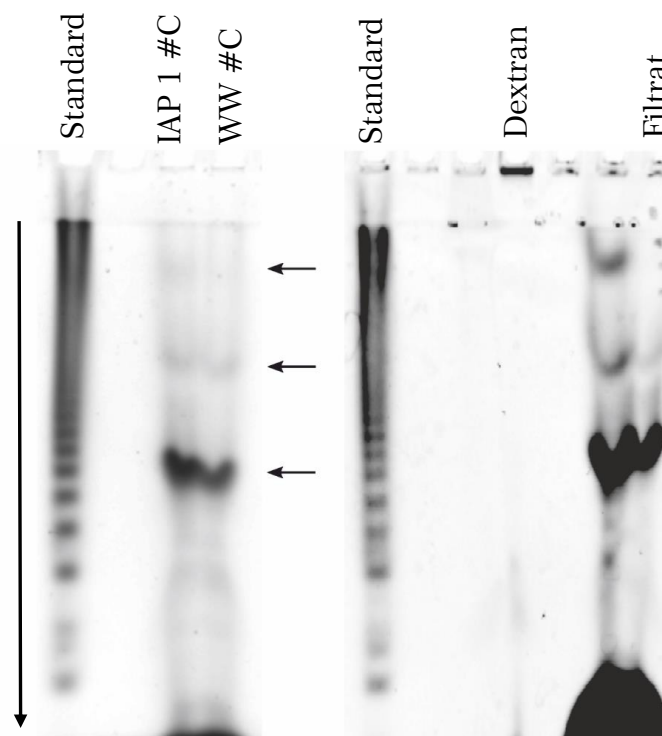


Abbildung 3.48: Das FACE-Gel des Waschwassers (WW) und der aufgereinigten Lösung (IAP 1) der #C-Birkenpollen gibt Hinweis auf drei geladene Polysaccharide, deren Größe aufgrund der unbekanntem Ladung des Moleküls nicht bestimmbar ist. Das nicht geladene Referenzmolekül Dextran (150 kDa) wandert wegen der fehlenden Ladungen im Molekül und der großen Masse im Vergleich zu den ebenfalls ungeladenen Markermolekülen (Monomereinheit Glucose; max. 3.4 kDa) nicht in das Gel hinein. Die 100 kDa-Überstandsprobe ist angereichert an den zwei geringer konzentrierten Molekülen mit höherer Molmasse oder geringerem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis, die möglicherweise die zwei Eisnukleatoren sind. Das kleinste Molekül bzw. das mit dem höchsten Ladungs-zu-Masse-Verhältnis ist in deutlichem Überschuss vorhanden, wie es für das eisadsorbierende Molekül aus den IR-Spektren vermutet wurde. Abbildung mit Überarbeitung aus Dreischmeier et al. (2017).

Über die absoluten Massen lassen sich keine Informationen erhalten, da die Wanderungsgeschwindigkeit auch abhängig von der Anzahl an Ladungen in den Molekülen selbst ist. Die Tatsache, dass das ungeladene Dextran mit einer im Vergleich zu dem Standard großen Molmasse von 150 kDa nicht in dem Gel wandert, zeigt die Anwesenheit von negativ geladenen funktionellen Gruppen in den Birkenpollenmolekülen auf und bestätigt damit indirekt die zuvor getroffene Annahme von anionischen Polysacchariden. In der 100 kDa-Überstandslösung (10 x gewaschen) sind die beiden größeren Moleküle bzw. die mit dem niedrigsten Ladung-zu-Masse-Verhältnis im Vergleich mit der entsprechenden Filtrat-Lösung angereichert, was mit der Anwesenheit der beiden Eisnukleatoren mit Molmassen größer als 100 kDa im Zusammenhang stehen könnte. Grundsätzlich bestätigt dieses Gel die auch aus den IR-Spektren ([Kapitel 3.1.3](#)) ablesbare Bildung weniger verschiedener, aber bezüglich der Molmasse und des Masse-Ladungs-Verhältnisses definierter Polysaccharide.

A.10. Weitere spektroskopische Analytik und SDS-PAGE an *M. alpina*

Die Restlösungen der Aufreinigungsprozeduren von *M. alpina* wurden über 100 kDa-Zentrifugenfilter aufgetrennt und zunächst über IR-Spektroskopie untersucht ([Abbildung A.18](#)). Die Filtratspektren (rosa bzw. lila) weisen ein der Stammlösung bzw. der IAP-Restlösungen (hell- bzw. dunkelgrün) ähnliches Muster auf. Dagegen unterscheiden sich die Überstandsspektren (hell- bzw. dunkelblau) von diesen Misch-Spektren dadurch, dass sie ein definierteres Bandenmuster aufweisen. Die sehr intensiven, für Proteine charakteristischen Amid I- und Amid-II-Banden bei etwa 1650 cm^{-1} und 1540 cm^{-1} , die auf die C=O- bzw. C-N-Valenz in Kombination mit einer N-H-Deformationsschwingung zurückzuführen sind (Barth, A. and Zscherp, C., 2002), zusammen mit den Banden bei 1075 cm^{-1} und 1037 cm^{-1} könnten von einem Glykoprotein stammen ([Tabelle A.7](#)). Die Vermutung, dass es sich darum um den Eisnukleator handelt, ist allerdings mit Vorsicht aufzustellen, da trotz des mehrmaligen Waschens des Überstandes keine Information über die Reinheit der Probe vorliegt und daher die Banden auch von mehreren Molekülen beigetragen werden könnten. Dazu ist zu vermerken, dass einerseits beide Probenpräparationen Protein- und Zuckerbanden aufweisen, andererseits jedoch zum Teil unterschiedliche Absorptionsmaxima und -banden besitzen. Beispielsweise sind die Amid-I- und Amid-II-Banden im Überstand 2017-Spektrum (dunkelblau) zu etwas höheren Wellenzahlen relativ zu dem Überstand 2016-Spektrum (hellblau) verschoben, was aus unterschiedlichen Proteinbeiträgen resultieren könnte.

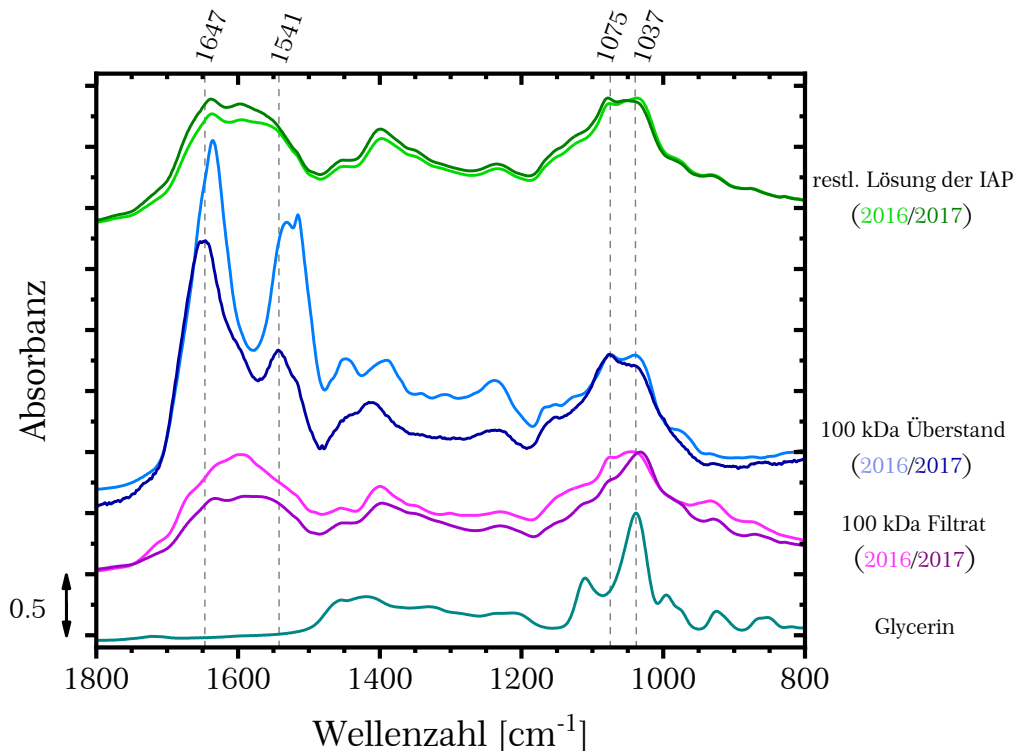


Abbildung A.18: Die IR-Spektren der 100 kDa-Überstände (blau) der Restlösungen der beiden Aufreinigungen zeigen für Proteine und Zucker typische Banden, was möglicherweise auf ein Glykoprotein als Eisnukleator zurückzuführen ist. Dagegen sind die Spektren der Startlösung dieses Zentrifugenfilterexperimentes (grün) und die 100 kDa-Filtrate (lila) untereinander vergleichbar, aber weniger definiert. Aufgrund von Spuren an Glycerin (türkis) in den Filtern können die Filtratspektren, wie das Beispiel von Filtrat 2017 zeigt, bei geringen Probenkonzentrationen mit dem Glycerinspektrum überlagert sein.

Die Zentrifugenfilter enthalten Spuren von Glycerin (türkis), weshalb sie vor der Probenpräparation mehrmals mit Wasser gespült werden mussten, damit besonders im IR-Spektrum des Filtrats keine Glycerin-typischen Banden mehr auftauchen. Vor allem bei geringeren Probenkonzentrationen kann der geringe Glycerinbeitrag das Spektrum stören, wie das Filtrat 2017-Spektrum (lila) im Zuckerbereich zwischen 1000 und 1100 cm^{-1} zeigt. Für diese Probenfiltration wurde der Filter zwar dreimal mit Wasser vorgespült, was aber scheinbar nicht ausreichend gewesen war, sodass das Filtratspektrum eine Überlagerung des Proben- und des Glycerinspektrums ist. Das entsprechende Überstandsspektrum ist dagegen davon unbeeinflusst.

Dieses Filtrationsexperiment wurde mit der restlichen Lösung der Aufreinigung durchgeführt, die sämtliche Moleküle enthält. Von der aufgereinigten Lösung, deren Analyse mehr Informationen bezüglich der Struktur der eisbindenden Moleküle geliefert hätte, stand nicht mehr genügend Probe zur Verfügung. In einer verdünnten Probe hätte die Konzentration der Moleküle bei einer Vermessung am 1-fach-reflektiven ATR-Kristall, auf den aufgrund des Defektes der ATR-Zelle mit neun Reflexionen in der letzten Phase der Arbeit ausgewichen werden musste, nicht ausgereicht.

A.10.1. SDS-PAGE mit *M.alpina*

Diese proteinspezifische Gelelektrophoresemethode SDS-PAGE wurde hier eingesetzt, um mehr Informationen über das als Eisnukleator vermutete Protein mit einer aus den Zentrifugfilterexperimenten erhaltenen Größe von mindestens 100 kDa zu bekommen. Da allerdings der verwendete Marker Referenzproteine bis lediglich 116 kDa aufweist, ist die Skepsis bezüglich des Gelingens, die Molare Masse genauer bestimmen zu können, gerechtfertigt. Tatsächlich ist in dem Gel (**Abbildung A.19**) weder nach der Coomassie-Färbung (links) noch nach der deutlich sensitiveren Silberfärbung (rechts) eine Bande bei Molmassen > 100 kDa zu detektieren. Dieses negative Ergebnis kann mehrere Gründe haben: Entweder ist das Protein zu groß und wandert nicht in das Gel hinein oder nicht weit genug, um es in dem Ausschnitt detektieren zu können. Zweitens könnte der Eisnukleator ein Agglomerat mehrerer kleiner Moleküle sein, das bei der Probenpräparation für das Gel zerstört wird und somit nur die kleineren Moleküle sichtbar werden. Dafür könnte sprechen, dass sich in der Überstandsspalte (dunkelblau), in der erwartungsgemäß der proteinöse Eisnukleator enthalten sein sollte, nach der Silberfärbung zwei Banden bei etwa 35 kDa und 50 kDa erkennen lassen, die auch in den Laufreihen der Restlösung (grün) und des Filtrats (lila) auftauchen. Diese Beobachtung könnte allerdings auch ein Anzeichen dafür sein, dass die Proteine mittlerer Größe im Gegensatz zu den Molekülen < 20 kDa nicht vollständig aus dem Filter heraus gespült wurden.

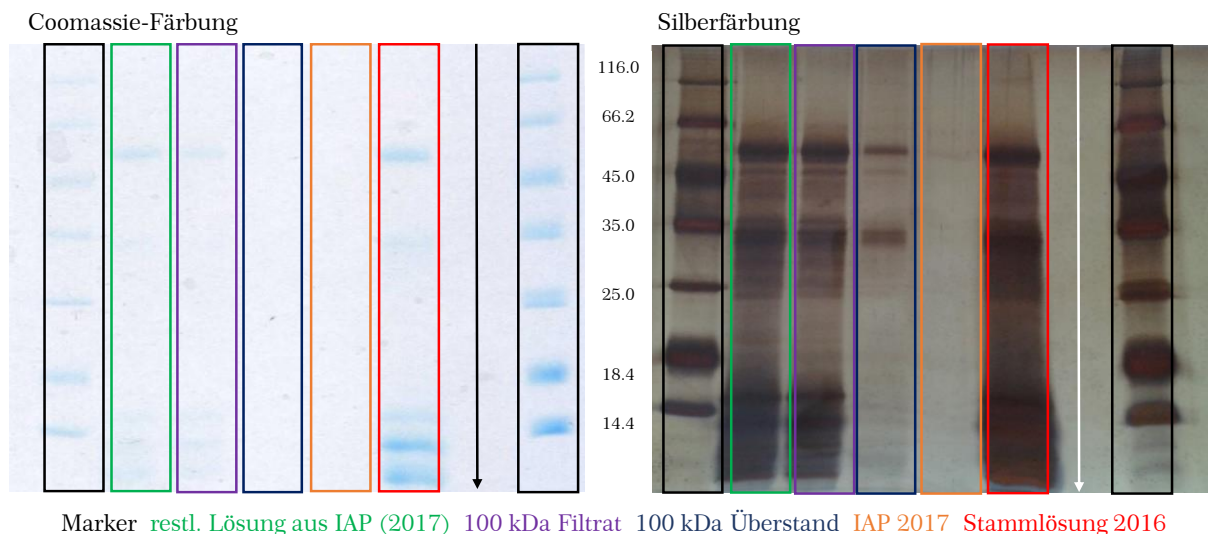


Abbildung A.19: SDS-PAGE-Gel von verschiedenen *M. alpina*-Lösungen, a) nach Coomassie-Färbung und b) nach anschließender Silberfärbung zum Nachweis weniger intensiver Banden. Die Laufrichtung der Proben erfolgte in dieser Ansicht von oben nach unten. Zwischen den Gel-Fotos sind die Molaren Massen des Markers (schwarzer Kasten) in kDa an die zugehörige Bande geschrieben. Die Farben der umrandenden Kästen entsprechen den Textfarben der entsprechenden Proben. Um die beiden schwachen Banden in der Überstandslösung (blau) aufzulösen, musste bei der Silberfärbung das übrige Gel überbelichtet werden.

Damit ergibt sich auch die Möglichkeit, dass die in **Abbildung A.18** dargestellten IR-Spektren der Überstandssproben (dunkelblau) eine Überlagerung mehrerer Proteinspektren sind, sodass der sich in der Überstandssprobe befindende Eisnukleator

nicht zwingend das detektierte Protein oder überhaupt ein Protein sein muss. Das wiederum wäre eine mögliche Erklärung für die fehlende Bande bei großen Molmassen in dem SDS-PAGE-Gel.

A.10.2. UV-VIS-Spektren *M. alpina*

Bei Betrachtung der UV-VIS-Spektren (s. **Abbildung A.20**) der dreimal gewaschenen 100 kDa-Überstandslösung (dunkelblau) im Vergleich mit der 100 kDa-Filtrat- (lila) und der Startlösung (Restlösung aus IAP 2017, grün), wobei die Filtrat- und Überstandslösung im Anschluss an die Filtration jeweils auf das Volumen der Startlösung gebracht wurden, fällt die sehr geringe Konzentration in dem Überstand auf. Die Absorbanz beträgt mit 0.01 bei dem Absorptionsmaximum von 278 nm weniger als 2 % der Absorbanz der Startlösung mit 0.73 bei 260 nm. Wird diese enorm geringe Konzentration bei der Auswertung des SDS-PAGE-Gels berücksichtigt, kann eine auch für die Silberfärbung zu niedrige Konzentration des eisnukleierenden Proteins mit größeren oder anderen Molmassen als 35 oder 50 kDa als Argument angeführt werden, dass keine Bande detektiert wurde. Das würde dann jedoch auch bedeuten, dass dessen Beitrag zu dem IR-Spektrum der Überstandsprobe im Vergleich zu den beiden anderen Proteinen marginal ausfällt.

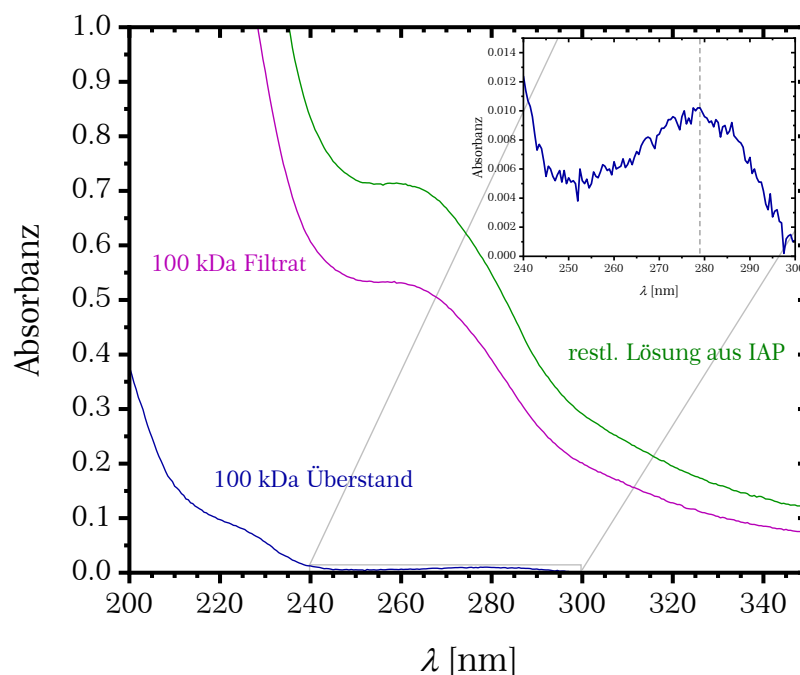


Abbildung A.20: UV-VIS-Spektren der Proben eines Zentrifugenfilterexperimentes mit einer bei der IAP übrig bleibenden Lösung (grün) von *M. alpina*. Während im Filtrat (lila) weiterhin neben Proteinen zahlreiche DNA-Moleküle enthalten sind, wie aus dem Absorptionsmaximum bei 260 nm zu schließen ist, ist der gewaschene Überstand (dunkelblau) davon gereinigt und enthält hauptsächlich Proteine mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 280 nm. Desweiteren ist die sehr geringe Konzentration der Proteine in der Überstandslösung auffällig.

Die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 260 nm auf 278 nm deutet auf die Reinigung der ursprünglichen Lösung von u.a. DNA-Molekülen aus dem Pilzextrakt

und auf das Verbleiben von Proteinen in dem 100 kDa-Überstand hin. Dass in dem Gel keine Bande in der Laufreihe der aufgereinigten IAP-Probe erscheint, könnte auf eine zu geringe Konzentration zurückgeführt werden, liegt hier aber in dem vermuteten polysaccharidischen Charakter des Moleküls begründet.

A.11. Ratenabhängigkeit der heterogenen Eisnukleation in BPWW

In Anlehnung an die Arbeiten von Herbert et al. (2014) sowie Budke und Koop (2015) zum stochastischen Charakter der heterogenen Nukleation wurden in dieser Arbeit DSC-Messungen an Birkenpollenwaschwasserproben #A bei verschiedenen Kühlraten durchgeführt, um eine mögliche Kühlratenabhängigkeit der heterogenen Nukleationstemperaturen zu untersuchen. Unterschieden wird hier einerseits zwischen zwei Messprozeduren, bei denen in einer Messung die Kühlraten von verschiedenen Werten startend variiert werden ((1): $-1 \rightarrow -2 \rightarrow -5 \rightarrow -10 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ oder (2): $-10 \rightarrow -5 \rightarrow -2 \rightarrow -1 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$) und andererseits zwischen Lösungen verschiedener Wasseraktivitäten a_w (1; 0.95; 0.9). Es hat sich gezeigt, dass die Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität von Glucose-NaCl-Lösungen im molaren Verhältnis von 2:1 vernachlässigbar ist und a_w durch die wasseraktivitätsbasierte Nukleationstheorie (Koop et al., 2000; Koop and Zobrist, 2009) beschrieben werden kann. Es ist eine sehr geringe Absenkung der Nukleationstemperaturen mit steigender Kühlrate festzustellen (s. **Tabelle A.11**), die charakteristisch für ein stochastisches Verhalten des Nukleationsprozesses ist. Bei höherer Kühlrate wird dasselbe Temperaturintervall in einer kürzeren Zeit durchschritten, sodass eine geringere Nukleationswahrscheinlichkeit vorliegt. Diese Kühlratenabhängigkeit ist umso stärker ausgeprägt, je geringer die Wasseraktivität und damit Nukleationstemperatur ist. Aufgrund der Nicht-Linearität der Abhängigkeit der Phasenübergangstemperaturen von der Wasseraktivität nach der Parametrisierung von Koop und Zobrist (2009) sollte eine Variation der Kühlrate mehr ins Gewicht fallen. Unter Berücksichtigung des generellen Messfehlers von $\pm 0.3 \text{ } ^\circ\text{C}$ kann eine eindeutige Kühlratenabhängigkeit der heterogenen Nukleation jedoch nicht erkannt werden.

Die Temperaturen des zweiten Signals wurden über den Knick zwischen den beiden Signalen abgeschätzt und sind daher mit einem größeren Fehler behaftet, sodass sie in der folgenden Auswertung nicht berücksichtigt werden. Über **Gleichung (A.5)** wird der Parameter λ (nicht zu verwechseln mit der Wellenlänge von Licht) bestimmt, der eine nützliche Größe zur Einordnung der heterogenen Nukleation als stochastischen Prozess (λ klein) oder Ereignis mit singulärem Charakter (λ groß) darstellt (Herbert et al., 2014).

$$\lambda = \frac{1}{\Delta T_{f,50}} \cdot \ln \left(\frac{\beta_1}{\beta_2} \right) \quad (\text{A.5})$$

Die Werte für λ in BPWW liegen bei $8 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, was vergleichbar ist mit den Werten anderer Eiskeime wie Snomax (7.4 bzw. $8.7 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$), Mineralstäube ($1-4.6 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$) oder Bodestaub ($6.3 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$) (Budke, C. and Koop, T., 2015). Der Wert von $\lambda = 18 \text{ }^\circ\text{C}$ bei $a_w = 1$ in der Messung nach Methode (1) ist im Gegensatz zu den weiteren Werten (**Tabelle A.12**) scheinbar ein Ausreißer und wird aus diesem Grund nicht zur weiteren Analyse herangezogen. Diese Werte zeigen den (schwachen) stochastischen Charakter der heterogenen Nukleation auf, was durch den vergleichbaren Wert für die stochastische homogene Nukleation mit $3-4 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ (diese Arbeit) oder $3.83 \pm 0.61 \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ (Riechers et al., 2013) bestätigt wird. Ebenso spricht die Abnahme von λ mit sinkender Wasseraktivität für die Stochastik des Prozesses. Andererseits ist für die stochastische homogene Nukleation kein vergleichbarer Trend zu erkennen, was vermutlich aus der Temperaturungenauigkeit resultiert.

Der stochastische Charakter der heterogenen Nukleation kann aus diesen Messungen nur andeutungsweise abgeleitet werden, da dieser sehr gering ausgeprägt zu sein scheint. Die Auswertung der Eisnukleationseigenschaften der Birkenpollen-Eisnukleatoren über die auf der singulären Theorie beruhenden kumulativen Keimspktrern (**Kapitel 3.1.1**) ist daher begründet.

Tabelle A.11: Differenzen zwischen den DSC-Nukleationstemperaturen bei verschiedenen Kühlraten und Wasseraktivitäten. Die Temperaturen des zweiten heterogenen Signals wurden aus dem nicht immer eindeutig erkennbaren Knick zwischen den beiden Signalen ausgewertet. Zu beachten ist der allgemeine Temperaturfehler von $\pm 0.3 \text{ }^\circ\text{C}$.

$a_w = 1$	$T_{\text{het},1} (1)$	$T_{\text{het},1} (2)$	$T_{\text{het},2} (1)$	$T_{\text{het},2} (2)$	$T_{\text{hom}} (1)$	$T_{\text{hom}} (2)$
1-10	0.11	0.29	1.14	1.30	0.54	0.71
1-2		0.07	0.25	0.34	0.16	0.16
1-5	0.06	0.17	0.85	0.87	0.38	0.41
2-5	0.07	0.10	0.6	0.53	0.22	0.25
2-10	0.12	0.22	0.89	0.96	0.38	0.55
5-10	0.05	0.12	0.29	0.43	0.16	0.30
$a_w = 0.95$	$T_{\text{het},1} (1)$	$T_{\text{het},1} (2)$	$T_{\text{het},2} (1)$	$T_{\text{het},2} (2)$	$T_{\text{hom}} (1)$	$T_{\text{hom}} (2)$
1-10	0.35	0.31	0.85	0.85	0.86	0.83
1-2	0.02	0.02	0.13	0.17	0.19	0.21
1-5	0.17	0.18	0.49	0.42	0.54	0.52
2-5	0.15	0.16	0.36	0.25	0.35	0.31
2-10	0.33	0.29	0.72	0.68	0.67	0.62
5-10	0.18	0.13	0.36	0.43	0.32	0.31
$a_w = 0.90$	$T_{\text{het},1} (1)$	$T_{\text{het},1} (2)$	$T_{\text{het},2} (1)$	$T_{\text{het},2} (2)$	$T_{\text{hom}} (1)$	$T_{\text{hom}} (2)$
1-10	0.39	1.05	0.53		0.51	0.79
1-2	0.16	0.25	0.31		0.14	0.23
1-5	0.44	0.69	0.52		0.37	0.54
2-5	0.28	0.44	0.21	0.54	0.23	0.31
2-10	0.23	0.8	0.22		0.37	0.56
5-10		0.36	0.01		0.14	0.25

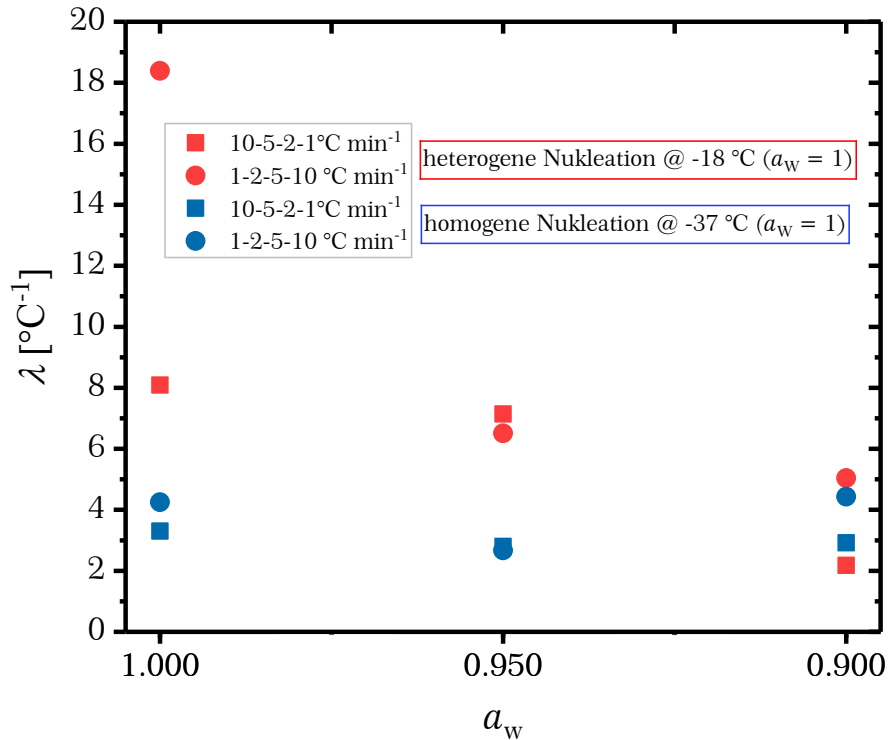


Abbildung A.21: Aus Gleichung (A.5) berechnete Mittelwerte für den Parameter λ bei verschiedenen Wasseraktivitäten, der den stochastischen Charakter der heterogenen (rot) und homogenen (blau) Nukleationsprozesse angibt.

Tabelle A.12: Werte für λ für die heterogene (het.) und homogene (hom.) Nukleation, die aus den beiden Messprozeduren ((1) bzw. (2)) erhalten wurden.

a_w	1	0.95	0.9
het. (1)	18.39	6.51	5.04
het. (2)	8.09	7.14	2.18
hom. (1)	4.25	2.67	4.43
hom. (2)	3.3	2.8	2.92

A.12. Vergleich zweier Messmethoden zur Erfassung der Thermischen Hysterese

Tabelle A.13: Übersicht über die zwei in dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Erfassung der Thermischen Hysterese.

	Mikroskop	DSC
Temperaturgenauigkeit	$\pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$	$\pm 0.05 \text{ }^\circ\text{C}$
Fehler in TH	$\pm 0.14 \text{ }^\circ\text{C}$	$\pm 0.07 \text{ }^\circ\text{C}$
Probenmenge	einige nl (+Squalen)	5 μl (ggf. +Squalen)
Vorteile	optische Beobachtung: Kristallgröße oder sonstige Effekte sichtbar; wenn Kristall bei T_m stabil, dann geringer Messaufwand; Videos generierbar	einfacheres Handling: Kristalle schmelzen nicht so leicht weg; höhere Temperaturgenauigkeit; auch ohne Öl möglich
Nachteile	wegen geringerer Temp.-Genauigkeit schmilzt Kristall leicht weg (hohes Frustrationspotential); Emulsion	keine Information über Probe/Kristallgröße; höherer zeitlicher Messaufwand zur Erfassung von T_m
TH beeinflussende Messparameter (v.a. bei hypAFPs)	Halte-/Messzeit; Kristallgröße; Kühlrate	Halte-/Umkehrtemperatur; Kühlrate

Abkürzungsverzeichnis

#A-C	Chargenbezeichnung der Birkenpollen
ACW	Anchored Clathrate Waters (verankerte Clathratwassermoleküle)
AF(G)P	Antigefrier(glyko)protein
ATR	Attenuated Total Reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
(bi)dest.	zwei- bzw. einmal destilliertes Wasser
BINARY	Bielefeld Ice Nucleation Array (Messgerät zur optischen Detektion von Eiskernereignissen in Mikrolitertropfen)
BPS	Birkenpollensuspension
BPWW	Birkenpollenwaschwasser
CCN	Cloud Condensation Nucleus (Wolkenkondensationskeim)
CN	Cellulosenitrat (Material des Membranfilters)
CNT	Classical Nucleation Theory (Klassische Nukleationstheorie)
DSC	Differential Scanning Calorimetry (dt. Bezeichnung: Dynamische Differenzwärmestromkalorimetrie)
FACE	Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis
Gew%	Gewichtsprozent
IAP	Ice Affinity Purification (Eisaffinitätsaufreinigung)
IN	Ice Nucleus (Eiskeim)
INP	Ice Nucleating Protein (eiskernendes Protein)
IR	Infrarot(-Strahlung)
IRI	Ice Recrystallization Inhibition (Eisrekristallisationsinhibierung)
IRRINA	Ice Recrystallization Rate Inhibition Analysis (Auswertungsmethode IRI)
ISP	Ice Shell Purification (Eisfilmaufreinigung)
LSW	Lifshitz-Slyozov-Wagner(-Theorie)
<i>M. alpina</i>	<i>Mortierella alpina</i> (Pilzart)
MBP	Maltose Binding Protein (Maltose bindendes Protein)
(N)IBS	(Non)Ice Binding Site ((Nicht) Eisbindende Stelle)

PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDA	Potato Dextrose Agar (Nährboden)
PDB	Proteindatenbank
PDMS	Polydimethylsiloxan (Polymer)
PES	Polyethersulfon (Filtermaterial)
PVA	Polyvinylalkohol
RH	Relative Humidity (relative Luftfeuchtigkeit)
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis
Span65®	Emulgator Sorbitantristearat
TH	Thermische Hysterese
Tm/T. molitor	Tenebrio molitor (Mehlkäfer)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett(-Strahlung)
v:v	Volumenverhältnis in einem binären Gemisch
Vol%	Volumenprozent

Häufig verwendete Formelzeichen

a_w	Wasseraktivität
c_i	effektive Konzentration zur quantitativen Beschreibung der IRI-Aktivität (IRRINA)
f_{Eis}	kumulativer Anteil gefrorener Tropfen eines Ensembles
$K(T)$	Kumulatives Eiskeimspektrum
$k_{d(0)}$	(eisanteilkorrigierte) diffusionskontrollierte Ratenkonstante (IRRINA)
$k_{i(0)}$	(eisanteilkorrigierte) wachstumsinhibierte Ratenkonstante (IRRINA)
k_{LSW}	Ratenkonstante bei einem Eisanteil $Q \rightarrow 0$ für einen diffusionskontrollierten Prozess (LSW-Theorie)
$n_x(T)$	Kumulatives Eiskeimspektrum, das auf die Masse ($x=m$), die Anzahl an Eiskeimen ($x=n$) oder deren Oberfläche ($x=A$) bezogen sein kann
Q	Eisanteil (IRRINA)
r^3	mittlerer kubischer Radius (IRRINA)
r_{krit}	kritischer Radius eines Eisembryos (CNT)
T_{50}	Median-Gefriertemperatur eines Ensembles
T_{het}	heterogene Nukleationstemperatur
T_{hom}	homogene Nukleationstemperatur
T_m	Schmelztemperatur

Danksagung

Was lange währt, wird endlich gut. Nach über vier Jahren Laborarbeit, Datenauswertung, Literaturrecherche, Praktikantenbetreuung (BasisPC!), Tagungen mit Posterpräsentation, paper schreiben, Workshops, Vorträgen und einem halben Jahr Zusammenschreiben dieser Arbeit kommt alles doch noch zu einem guten Ende. Dass Du, liebe*r Leser*in, nun diese Dissertation in den Händen hältst, ist dabei nicht das alleinige Ergebnis meiner Mühen und Aktivitäten, sondern resultiert auch aus der guten Zusammenarbeit und Kooperation vieler, denen an dieser Stelle der entsprechende Dank gebührt werden soll.

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Koop danken für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe im Anschluss an die Masterarbeit das Thema weiterverfolgen und neue spannende Fragen beantworten zu können. Ich danke ihm für die viele Zeit und die Bereitschaft, die er für zahlreiche Diskussionen und Besprechungen aufgebracht hat, und die zahlreichen Vorschläge und Anregungen für weitere Aufgaben. Danke für die gute Unterstützung und Betreuung bei dieser Arbeit. Desweiteren möchte ich für den umfangreichen Beitrag zu den Publikationen danken.

PD Dr. Tilman Kottke gilt mein Dank nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens, sondern auch für die Möglichkeit, am IR-Spektrometer messen zu dürfen. Ich spreche ihm zudem für seine Hilfe, interessante Diskussionen und die gute Zusammenarbeit bei meiner ersten Publikation meinen Dank aus.

Ein besonderes Dankeschön geht an die aktuellen und ehemaligen Kolleg*innen der Arbeitsgruppe PC II für die Kooperation in der Laborarbeit und die nette Arbeitsatmosphäre mit gemeinsamen Events, Betriebsausflügen und Weihnachtsfeiern, besonders an Anja, Carsten, Dette und Evi, die mich die gesamte Zeit begleitet hatten. Jan, Lukas und Marco sollen hier nicht unerwähnt bleiben. Danke auch euch für die Auflockerung in der Mittagspause, obwohl das meiste in den letzten Monaten leider an mir vorbei gegangen ist.

Carsten gebührt der Dank für seine Diskussionsbereitschaft und gute Tipps, für die Kommunikation auch nach seiner Zeit bei uns sowie für die Einweisungen in die Messgeräte. Für ihren unermüdlichen Einsatz zur Aufrechterhaltung des Laboralltags danke ich Anja. Besonders erwähnenswert ist ihr Aufwand zur Beschaffung des Bargelds zur Bezahlung der fehlgeleiteten Birkenpollen. Meinen ehemaligen Büronachbarn Deepa und Marian sowie Lukas danke ich für die (zumeist) ruhige Atmosphäre, die die Grundlage für eine gute Arbeit im Büro ist.

Der Beitrag meiner Forschungspraktikanten Lars, Viktor, Jan-Lukas und Tim sowie des damaligen Masteranden Lukas zu meiner Arbeit soll nicht zu kurz kommen. Ein großes Danke für eure Arbeit und neuen Ideen. Lukas danke ich, dass das Thema

Mikrofluidik in meiner Zeit doch noch seinen Anfang genommen hat. Danke hier auch an Birte für ihre Mithilfe bei der Einrichtung der Mikrofluidikapparatur.

Anna Kunert und Bernhard Pummer vom Max-Planck-Institut für Chemie in Mainz sei für die zeitaufwendige Präparation der Pilzproben gedankt. Desweiteren danke ich den Mitarbeiter*innen der Hebräischen Universität von Jerusalem, insbesondere Vera Sirotinskaya, für die Herstellung der Proteinproben.

Den Doktorand*innen und Praktikant*innen der PC III und BioPC danke ich für die gute Zusammenarbeit auf der Laborebene E1. Besonders den BioPC'ler*innen möchte ich meinen Dank aussprechen für die Kooperation und Hilfestellungen bei der Bedienung der IR-Spektrometer. Uwe danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft und seine fachlichen Anregungen, insbesondere bei der Bedienung des Rotationsverdampfers sowie bezüglich der Gelelektrophoresen, für deren Durchführung ich mich bei Ina und Jonna bedanken möchte. Zudem danke ich Lara für die Bereitstellung der Hochgeschwindigkeits-kamera und Unterstützung bei den sehr interessanten Filmaufnahmen.

Maren danke ich für ihre Bemühungen bei der Größenausschlusschromatographie, die kurz vor Ende der Laborarbeitsphase leider nicht mehr zu einem verwertbaren Ergebnis gekommen war, und Phillipp für seine Informationen zur Gelelektrophorese und die Anweisung zur Durchführung einer Silberfärbung.

Dem Chemikalienlager und der Materialwerkstatt danke ich für die in der Regel problemlose Beschaffung von Chemikalien und Laborausstattung bzw. für die individuelle Anfertigung von kleineren Gerätschaften.

Carina gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit bei Versuch 1 des BasisPC-Praktikums, Evi für die im Spezi-Praktikum, sowie beiden für aufheiternde Gespräche über verunglückte Protokolle.

Danke auch an die "PC Allstars" für die starken Finnbahnrennen mit sagenhaften Platzierungen in den Top 5. Schade, dass uns eine Verbesserung in den letzten beiden Jahren nicht vergönnt war.

Bei Ramsia möchte ich mich für die aufmunternden und verständnisvollen Gespräche während der Laborzeit und besonders während der nervenaufreibenden Schreibphase danken. Es ist immer gut zu wissen, dass man nicht als Einzige mit den Unannehmlichkeiten, die die letzte Phase einer Doktorandenzeit mit sich bringt, kämpfen muss.

Mia danke ich für spaßige Unternehmungen und Unterhaltungen, die die unangenehmen Seiten des Unialltags vorübergehend vergessen ließen.

Zu guter Letzt danke ich meinen Freunden und vor allem meiner Familie für den großen mentalen Beistand nicht nur in den letzten Monaten.