

Aus dem Institut für Physik  
der Universität zu Lübeck

Direktor:  
Prof. Dr. C. G. Hübner

Mössbauerspektroskopie an  
*Magnetospirillum gryphiswaldense* und  
Eisen-Schwefel-Proteinen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Lars H. Böttger

aus Bad Segeberg

Lübeck 2007

1. Berichterstatter

PD Dr. H. Paulsen

2. Berichterstatter

Prof. Dr. B. F. Matzanke

Vorsitzender des Prüfungsausschusses

Prof. Dr. C. G. Hübner

Datum der Disputation:

13. 02. 2008

Zum Druck genehmigt,  
Lübeck, den 13. 02. 2008

gez. Prof. Dr. E. Hartmann  
Dekan der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theorie</b>	<b>3</b>
2.1 Der Mössbauereffekt . . . . .	3
2.1.1 $^{57}\text{Fe}$ -Mössbauereffekt . . . . .	4
2.1.2 Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung . . . . .	4
2.1.3 Elektrischer Feld Gradient (EFG) . . . . .	9
2.1.4 Magnetische Hyperfeinwechselwirkung . . . . .	10
2.1.5 Quadratischer Dopplereffekt . . . . .	11
2.1.6 Debye-Waller-Faktor . . . . .	11
2.1.7 Spin-Relaxation . . . . .	11
2.2 Magnetische Nanoteilchen . . . . .	12
2.2.1 Kristall-Anisotropie . . . . .	12
2.2.2 Stress-Anisotropie . . . . .	12
2.2.3 Interaktions-Anisotropie . . . . .	13
2.2.4 Form-Anisotropie . . . . .	14
2.2.5 Fluktuationen der Magnetisierungsrichtung . . . . .	14
2.2.6 Demagnetisierungsfeld . . . . .	18
2.3 Material . . . . .	18
2.3.1 Aufbau des Mössbauerspektrometers . . . . .	18
2.3.2 Rechencluster . . . . .	19
<b>3 Magnetospirillum gryphiswaldense</b>	<b>21</b>
3.1 Einleitung . . . . .	21
3.1.1 Magnetotaktische Bakterien . . . . .	21
3.1.2 Magnetit $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . . . . .	23
3.1.3 Typisches Mössbauerspektrum von <i>Magnetospirillum gryphis-</i> <i>waldense</i> (MSR-1) . . . . .	25
3.2 Material . . . . .	26
3.3 Magnetisch induzierte differentiale Lichtstreuung . . . . .	27
3.3.1 Einleitung . . . . .	27

3.3.2	Erweiterung der Bedeutung der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung . . . . .	27
3.3.3	Diskussion . . . . .	31
3.4	Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	31
3.4.1	Entfernung . . . . .	33
3.4.2	Dynamik des Wachstumsprozesses . . . . .	34
3.4.3	TEM Holographie . . . . .	35
3.4.4	Diskussion . . . . .	36
3.5	Mössbauerspektroskopie . . . . .	36
3.5.1	Das Wachstumsverhalten von <i>M. gryphiswaldense</i> . . . . .	36
3.5.2	Auftrennung der Bakterien . . . . .	51
3.5.3	Konversionselektronen Mössbauerspektroskopie . . . . .	58
3.5.4	$\Delta$ mamM und $\Delta$ mamB . . . . .	62
3.5.5	Wachstum in Abhängigkeit vom Medium . . . . .	64
3.5.6	Zusammenfassung . . . . .	69
<b>4</b>	<b>Proteine GcpE und LytB</b>	<b>73</b>
4.1	Isopren . . . . .	73
4.2	GcpE . . . . .	73
4.2.1	Rekonstituiertes Protein GcpE . . . . .	73
4.2.2	Das Protein GcpE <i>in vivo</i> . . . . .	76
4.2.3	Das isolierte Protein GcpE . . . . .	78
4.3	LytB . . . . .	78
4.3.1	Rekonstituiertes Protein LytB . . . . .	78
4.3.2	Das Protein LytB <i>in vivo</i> . . . . .	81
4.3.3	Das isolierte Protein LytB . . . . .	81
4.4	Zusammenfassung . . . . .	82
<b>5</b>	<b>Das Z-Protein des Lassa Virus</b>	<b>85</b>
5.1	Mössbauerspektroskopie am Z-Protein . . . . .	87
5.1.1	Proben ohne Zink . . . . .	87
5.1.2	Gemischte Eisen-Zink-Proben . . . . .	91
5.2	Rechnungen mit der Dichte-Funktional-Theorie (DFT) an rubredoxinartigen Eisenzentren . . . . .	93
5.2.1	DFT am Z-Protein des Pferdeherpes-Virus . . . . .	93
5.2.2	DFT Rechnungen an den Rubredoxinen aus <i>C. pasteurianum</i> und <i>P. abyssi</i> . . . . .	99
5.3	Schlussfolgerungen . . . . .	101
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>A</b>	<b>Spincrossoverkomplex und molekulare Magnete</b>	<b>109</b>

A.1	Der Spincrossoverkomplex $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$ . . . . .	109
A.1.1	NIS an $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$ . . . . .	109
A.1.2	LIESST am $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$ -System . . . . .	109
A.2	Molekulare Magnete . . . . .	115
<b>B</b>	<b>Weitere Mössbauerspektren</b>	<b>119</b>
<b>C</b>	<b>Quellenverzeichnis fremder Bilder</b>	<b>123</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
	<b>Liste eigener Veröffentlichungen</b>	<b>137</b>
	<b>Glossar</b>	<b>139</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>143</b>
	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>147</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>149</b>



# 1 Einleitung

Eisen ist eines der essentiellen Elemente aller bisher bekannten irdischen Lebensformen und übernimmt vielfältige Aufgaben in den Organismen. Dieses Element ist unverzichtbar zur Bindung von Sauerstoff in der Atmungskette der Säugetiere und dient dem Elektronentransfer bei biochemischen Prozessen.

Eine besondere Aufgabe kommt dem Eisen in Organismen zu, welche es zur Orientierung benutzen. Speziell Bakterien synthetisieren dazu Magnetosomen aus Eisenoxiden und -sulfiden. Aufgereiht an Filamenten ergeben diese Nanokristalle ein gemeinsames magnetisches Moment, welches ausreicht, das Bakterium in wässrigem Medium entlang des Erdmagnetfeldes zu orientieren. Diese Orientierung gewährt ihnen einen Vorteil bei der Suche nach Sedimentschichten mit idealen Lebensbedingungen. Bisher ist der Prozess dieser Synthese nur unvollständig verstanden. Die Mössbauerspektroskopie bietet hier die Möglichkeit, gezielt die einzelnen Syntheseschritte zu verfolgen und eventuelle Vorstufen zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit untersucht das Magnetit bildende Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* mittels der Mössbauerspektroskopie. Eine biochemische Auftrennung der Bakterien erlaubt eine Analyse der verschiedenen eisenhaltigen Bestandteile des Bakteriums und ermöglicht deren Identifikation. Gezielte Induktion mit  $^{57}\text{Fe}$  gibt die Möglichkeit, den zeitlichen Ablauf der Magnetitsynthese und das Entstehen des kooperativen magnetischen Moments im Bakterium zu beobachten. Die Analyse der geometrischen Anordnung der Magnetosomen und deren Einfluss auf die Mössbauerspektren, erlaubt den Prozess zur Entstehung von Magnetosomenketten zu untersuchen. Mutanten, deren Fähigkeit zur Magnetitbildung verändert wurden, ermöglichen die Identifikation von Genen, welche an der Magnetitsynthese beteiligt sind. Untersuchungen des Wachstumsverhaltens in unterschiedlichen Nährmedien und bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen erlauben die Eisenaufnahmemechanismen einzugrenzen. Die Experimente mittels der Konversionselektronen-Mössbauerspektroskopie geben Einblick in die Zusammensetzung der Magnetosomen.

Im Mittelpunkt des zweiten Teils dieser Arbeit standen die beiden Proteine GcpE und LytB des Bakteriums *E. coli* des neu entdeckten 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweges. GcpE und LytB katalysieren dabei die letzten beiden Schritte der Isoprensynthese. Beide Proteine enthalten einen  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster und sind daher geeignet, durch die Mössbauerspektroskopie beobachtet zu werden. Insbesondere können die

Veränderungen der Proteine durch die beteiligten Substrate verfolgt werden. Neben der Charakterisierung von rekonstituierten GcpE und LytB Proteinen wurden auch das *in vivo* Auftreten der beiden Proteinen in überexprimierenden *E. coli* Bakterien untersucht. Die Charakterisierung der aus diesen Zellen isolierten GcpE und LytB Proteine bildete den Abschluss dieses Kapitels.

Das Z-Protein des Lassa Virus, welches im dritten Teil dieser Arbeit untersucht wurde, ist ein natives Zinkfingerprotein. Das Genom stellt durch sieben Cysteine und ein Histidin zwei metallbindende Zentren zur Verfügung, welche außer mit Zink auch mit Eisen beladen werden können. Die Mössbauerspektroskopie kann die beiden Zentren aufgrund der verschiedenen Ligandenumgebungen unterscheiden und eignet sich dazu, dieses Eisen-Schwefel-Protein zu charakterisieren. Hierbei stand vor allem die Frage nach dem Verhalten des Proteins unter teilweiser Zinkzugabe als auch das Verhalten unter reduktivem Stress im Vordergrund. Der Vergleich der Mössbauerergebnisse mit denen durch Dichte-Funktional-Theorie (DFT) Rechnungen gewonnen erlaubt Rückschlüsse auf den Eisenbindungsmechanismus an diesem Protein. Die Güte der Vorhersagen der Mössbauerparameter durch die DFT-Rechnungen wird durch Vergleich mit den aus der Literatur bekannten Daten für Eisen-Schwefel-Zentren der Mössbauerspektren der Bakterien *Clostridium pasteurianum* und *Pyrococcus abyssi* bestätigt.

Das erste Kapitel des Anhangs dieser Arbeit widmet sich der Untersuchung des Spincrossover Komplexes  $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$  und dreier molekularer Magneten.

An diesem Spincrossover-Komplex lässt sich bei tiefen Temperaturen der LIESST-Effekt (Light Induced Excited Spin State Trapping) zeigen. Diese Art der Komplexe werden daher als Kandidaten für optische Speicher mit extrem hoher Kapazität angesehen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen an diesem Komplex standen die geordneten und ungeordneten Zustände. Diese wurden in den Spektren der Nuklearen-Inelastischen-Streuung (NIS) sichtbar und Rechnungen mittels DFT erlaubten eine Vorhersage dieser Zustände. Durch die Mössbauerspektroskopie konnte der Nachweis geführt werden, dass sich der LIESST-Effekt durch handelsübliche LEDs hervorrufen lässt.

Bei den molekularen Magneten handelt es sich um polynukleare multivalente Eisenmoleküle. Diese Molekülgruppe steht im Interesse der Forschung aufgrund der Möglichkeit, konstruierbare molekulare Magnete zu schaffen. Dieser Teil der Arbeit widmet sich der Charakterisierung dreier solcher Moleküle.

# 2 Theorie

## 2.1 Der Mössbauereffekt

Der Mössbauereffekt beschreibt die rückstoßfreie Emission und Absorption eines  $\gamma$ -Quants durch geeignete Atomkerne. Emittiert ein freies Atom, welches sich in einem angeregten Kernzustand mit der Energie  $E_0$  befindet, ein  $\gamma$ -Quant, so ist die Energie  $E_{\gamma,em}$  des emittierten  $\gamma$ -Quants um den Betrag der Rückstoßenergie  $E_R$  des Atomkernes verringert:

$$E_{\gamma,em} = E_0 - E_R. \quad (2.1)$$

Auch ein sich im Grundzustand befindender freier Atomkern kann nur ein  $\gamma$ -Quant absorbieren, wenn das  $\gamma$ -Quant eine um die Rückstoßenergie  $E_R$  höhere Energie besitzt als für das zu erreichende Energieniveau nötig ist

$$E_{\gamma,ab} = E_0 + E_R, \quad (2.2)$$

da der Kern nach der Absorption noch den Impuls des  $\gamma$ -Quants übernehmen muss. Um eine resonante Absorption zu erhalten muss deshalb die Energie  $E_{\gamma,em}$  des emittierten  $\gamma$ -Quants (bzw. Niveaus) um die 2-fache Rückstoßenergie  $E_R$  gegenüber der Energie  $E_{\gamma,ab}$  des absorbierten  $\gamma$ -Quants (bzw. Niveaus) größer sein:

$$E_{\gamma,ab} = E_{\gamma,em} + 2E_R. \quad (2.3)$$

Eine Absorption findet deshalb nur statt, wenn die Linienbreite der beiden Niveaus ausreichend breit sind, so dass sie sich überlappen. Für das  $^{57}\text{Fe}$  Atom ist die Rückstoßenergie  $E_{R,^{57}\text{Fe}} = 1,95 \cdot 10^{-3}$  eV und die Linienbreite ergibt sich zu  $\Gamma = 4,55 \cdot 10^{-9}$  eV und ist damit um sechs Größenordnungen kleiner als die Rückstoßenergie [1]. Im Fall von freien Atomen ergibt sich damit eine verschwindend geringe Wahrscheinlichkeit für die resonante Absorption.

Für Atome, welche in ein Kristallgitter eingebettet sind, besteht eine endliche Wahrscheinlichkeit, dass der Impuls des Rückstoßes durch das Kristallgitter aufgenommen wird. R. L. Mössbauer [2, 3, 4] zeigte, dass dies zur resonanten Absorption führt, wenn sowohl bei der Emission, als auch bei der Absorption kein Gitterphonon angeregt wird und die Masse  $M_K$  des Kristallgitters groß ist gegenüber der Atommasse. Die auftretende Rückstoßenergie  $E_R$  wird dann (mit  $k$  als Betrag des Wellenvektors des Quants  $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ ,  $\lambda$  Wellenlänge des Quants)

$$E_R = \frac{(\hbar k)^2}{2M_K c^2} \approx 10^{-20} \text{ eV} \quad (2.4)$$

und ist wesentlich kleiner als eine typische natürliche Linienbreite eines angeregten Niveaus von circa  $10^{-8}$  bis  $10^{-10}$  eV und erlaubt deshalb die resonante Absorption.

### 2.1.1 $^{57}\text{Fe}$ -Mössbauereffekt

Beim Mössbauereffekt am Isotop  $^{57}\text{Fe}$  wird der Übergang des ersten angeregten Kernniveaus mit dem Kernspin  $I = \frac{3}{2}$  zum Grundzustand  $I = \frac{1}{2}$  ausgenutzt, welcher einer Übergangsenergie von  $\Delta E_{\frac{3}{2} \rightarrow \frac{1}{2}} = 14,4 \text{ keV}$  entspricht. Die mittlere Lebensdauer des ersten angeregten Zustandes des  $^{57}\text{Fe}$ -Kerns beträgt  $\tau = 1,4 \cdot 10^{-7} \text{ s}$  mit einer natürlichen Linienbreite von  $\Gamma = 4,7 \cdot 10^{-9} \text{ eV}$ . Diese Energie liegt im Bereich der Hyperfeinwechselwirkungen des  $^{57}\text{Fe}$ -Kerns.

Im allgemeinen liegen die  $^{57}\text{Fe}$ -Kerne in Quelle und Absorber in unterschiedlichen kristallographischen, elektronischen und chemischen Umgebungen vor, so dass die Aufspaltungen der Energieniveaus des Kerns nicht gleich sind und die Bedingung für resonante Absorption zerstört wird. Eine Energieverschiebung  $\Delta E_{\text{Quelle}}$  des emittierten  $\gamma$ -Quants ergibt sich aus der Dopplerverschiebung, wenn sich die Quelle relativ zum Absorber mit der Geschwindigkeit  $v$  bewegt

$$\Delta E_{\text{Quelle}} \cdot \left(1 - \frac{v}{c}\right) = \Delta E_{\text{Absorber}} \quad \text{bzw.} \quad (2.5)$$

$$E_{\gamma,em} \cdot \left(1 - \frac{v}{c}\right) = E_{\gamma,ab}. \quad (2.6)$$

Durch Variation der Geschwindigkeit  $v$  und damit der Energie des emittierten  $\gamma$ -Quants lässt sich die Resonanzbedingung wieder herstellen und die Energieniveaus des Absorbers bestimmen.

### 2.1.2 Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung

Kommt es zu Wechselwirkungen zwischen dem Atomkern und seinen Elektronen in der Hülle, die über Wechselwirkungen von Punktladungen hinausgehen, so wird eine Verschiebung oder sogar Aufspaltung der Energieniveaus beobachtet. Sei  $\Phi(\vec{x})$  für  $\vec{x} = (x_1, x_2, x_3)$  das elektrostatische Potential der Hüllenelektronen in der Umgebung des Kernortes  $\vec{x}_{\text{Kern}} = (0, 0, 0)$ . Dieses lässt sich in eine Taylor-Reihe entwickeln:

$$\Phi(\vec{x}) = \Phi_0 + \sum_{i=1}^3 \left( \frac{\partial \Phi}{\partial x_i} \right) \Big|_{\vec{x}=0} x_i + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left( \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_i \partial x_j} \right) \Big|_{\vec{x}=0} x_i x_j. \quad (2.7)$$

Der konstante Term  $\Phi_0 = \Phi(0, 0, 0)$  beschreibt die Wechselwirkung eines punktförmigen Kerns mit den Elektronen. Die Ladungsdichte des Kerns kann geschrieben werden als:

$$\int \rho(\vec{x}) \cdot d\vec{x} = Ze \quad (2.8)$$

mit der Kernladungszahl  $Z$ . Die Wechselwirkungsenergie ergibt sich dann aus dem Potential  $\Phi(\vec{x})$  und der Ladungsdichte des Kerns  $\rho(\vec{x})$ :

$$V = \int \rho(\vec{x})\Phi(\vec{x})d\vec{x}. \quad (2.9)$$

Wird die Taylor-Entwicklung von  $\Phi(\vec{x})$  in obige Gleichung eingesetzt, so ergibt sich:

$$V = eZ\Phi_0 + \sum_i \left( \frac{\partial\Phi}{\partial x_i} \right) \int x_i\rho(\vec{x})d\vec{x} + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left( \frac{\partial^2\Phi}{\partial x_i\partial x_j} \right) \int x_ix_j\rho(\vec{x})d\vec{x}. \quad (2.10)$$

Der erste Term in Gleichung 2.10 trägt zur potentiellen Energie des Kristallgitters bei [5]. Der zweite Term in Gleichung 2.7 ist ein Dipolterm, der für Kerne gleich Null sein muss<sup>1</sup>. Dies gilt ebenso für alle weiteren ungeraden Terme. Die Hesse-Matrix der zweiten Ableitungen ist symmetrisch und kann durch Drehung des Koordinatensystems in eine diagonale Matrix überführt werden:

$$\left( \frac{\partial^2\Phi}{\partial x'_i\partial x'_j} \right) = q_{ij}\delta_{ij}. \quad (2.11)$$

Höhere Terme als bis zur zweiten Ordnung sind mit der Mössbauerspektroskopie nicht auflösbar und können daher hier vernachlässigt werden. Die Wechselwirkungsenergie aus dem dritten Term der Gleichung 2.10 ergibt sich damit zu

$$V = \frac{1}{2} \sum_i q_{ii} \int \rho(\vec{x}')x'^2_i d\vec{x}' \quad (2.12)$$

$$= \frac{1}{2} \sum_i q_{ii} \int \rho(\vec{x}') \left( x'^2_i - \frac{r^2}{3} \right) d\vec{x}' + \frac{1}{6} \sum_i q_{ii} \int \rho r^2 d\vec{x}', \quad (2.13)$$

mit  $r^2 = \sum_i x'^2_i$ . Sei  $|\Psi|^2$  die elektronische Ladungsdichte, so gilt:

$$\Delta\Phi + 4\pi|\Psi|^2 = 0 \quad (2.14)$$

und insbesondere:

$$\Delta\Phi|_0 = \sum_i q_{ii} = 4\pi e|\Psi(0, 0, 0)|^2 \quad (2.15)$$

$$\begin{aligned} V &= \frac{2}{3}\pi e|\Psi|^2 \int \rho(\vec{x}')r^2 d\vec{x}' + \frac{1}{2} \sum_i \left[ q_{ii} \int \rho(\vec{x}') \left( x'^2_i - \frac{r^2}{3} \right) d\vec{x}' \right] \\ &= V_I + V_Q. \end{aligned} \quad (2.16)$$

$V_I$  führt auf die Isomerieverschiebung, der Term  $V_Q$  ergibt die elektrische Quadrupolaufspaltung.

<sup>1</sup>Ein Kern mit einem Dipolmoment würde gegen die Invarianz der Inversion verstoßen ( $|\Psi(r)|^2 = |\Psi(-r)|^2$ ).

### Isomerieverschiebung

Der Term für die Isomerieverschiebung ist sowohl von der elektronischen Ladungsdichte  $|\Psi|^2$  am Kernort als auch von dem Kernradius  $r$  abhängig. Der Kern nimmt für verschiedene Zustände gewöhnlich unterschiedliche Formen und damit auch andere Radien an. Ebenso beeinflussen die unterschiedlichen kristallographischen Umgebungen, in welche das Atom eingebettet ist, die elektronische Ladungsdichte im Kern. Im nicht-relativistischen Grenzfall haben nur s-Elektronen eine von Null verschiedene Ladungsdichte  $\rho_e$  im Kern

$$\rho_e(r_e) = \frac{1}{4\pi} \int \rho_e(\vec{r}_e) \sin \theta d\theta d\Phi. \quad (2.17)$$

Bei Elektronen gilt für kleine Abstände  $r_e$  vom Kern die Näherung

$$\rho_e(r_e) \approx \rho_e(0) \equiv |\Psi(0)|^2 e. \quad (2.18)$$

Die Energieverschiebung  $\Delta E = V_I^A - V_I^Q$  folgt dann zu

$$\Delta E = \frac{2}{3} \pi Z e^2 [|\Psi_A(0)|^2 - |\Psi_Q(0)|^2] \cdot [\langle r^2 \rangle_a - \langle r^2 \rangle_g] \quad (2.19)$$

mit  $Z$  als Kernladungszahl. Der Index  $A$  steht für die Wellenfunktion des Absorbers,  $Q$  für die der Quelle,  $a$  für den Radius des angeregten Kerns und  $g$  für den Radius des Kerns im Grundzustand. Der Differenzterm lässt sich schreiben als

$$\Delta \langle r^2 \rangle = \langle r^2 \rangle_a - \langle r^2 \rangle_g = \frac{1}{Z} \int r^2 (\rho_a(\vec{r}) - \rho_g(\vec{r})) dx. \quad (2.20)$$

In Geschwindigkeitseinheiten ergibt sich damit für die Isomerieverschiebung  $\delta$ :

$$\delta = \frac{2\pi c}{3E_\gamma} Z e^2 \Delta |\Psi(0)|^2 \Delta \langle r^2 \rangle \quad (2.21)$$

mit  $E_\gamma$  als der Mössbauerlinienenergie.

Eine direkte Berechnung ist schwierig, da sowohl die Kernradien  $r$  als auch die s-Elektronendichten ( $|\Psi(0)|^2$ ) nicht hinreichend exakt bekannt sind. Eine Möglichkeit, die Isomerieverschiebung zu berechnen, bieten die Dichte-Funktional-Theorie (DFT) Rechnungen [6].

Bei schwereren Kernen (mit  $A \approx \frac{1}{\alpha} \simeq 137$  als Anzahl der Nukleonen im Kern)<sup>2</sup> muss ein Übergang von der Schrödinger-Gleichung zu der relativistischen Dirac-Gleichung stattfinden. Hierzu sei auf weitergehende Literatur verwiesen [7].

Da die Gleichung 2.21 explizit einen Term sowohl für die Quelle ( $Q$ ) als auch für den Absorber ( $A$ ) enthält, muss die Angabe der Isomerieverschiebung relativ zu einer Referenz angegeben werden. In dieser Arbeit sind alle Werte der Isomerieverschiebung  $\delta$  relativ zu  $\alpha$ -Eisen bei Raumtemperatur angegeben.

<sup>2</sup> $\alpha$  entspricht der Feinstrukturkonstanten:  $\frac{1}{\alpha} \simeq 137$

### Quadrupolaufspaltung

Der Term  $V_Q$  aus Gleichung 2.16 führt auf die elektrische Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$ . Sei das Gitter nun bezüglich der  $z$ -Achse (mit  $i$  aus  $x, y, z$ ) ausgezeichnet und die beiden anderen Achsen völlig gleichwertig, so dass gilt  $q_{xx} = q_{yy} \neq q_{zz}$ . Für das elektrostatische Potential  $\Phi(\vec{x})$  ist die Differentialgleichung  $\Delta\Phi + 4\pi e|\Psi_e(\vec{x})|^2 = 0$  speziell an der Stelle 0 gültig, dann folgt:

$$q_{xx} = q_{yy} = \frac{1}{2}4\pi e|\Psi(0)|^2 - q_{zz}. \quad (2.22)$$

Sei  $\vec{E}$  die elektrische Feldstärke im Kristall, dann ergibt sich:

$$-\nabla\Phi = \vec{E} \quad (2.23)$$

$$q_{zz} = \left(\frac{\partial^2\Phi}{\partial z^2}\right)_{\vec{x}=0} = -\left(\frac{\partial E_z}{\partial z}\right)_{\vec{0}=0}. \quad (2.24)$$

Dieser Ausdruck für  $q_{zz}$  lässt sich in die Gleichung 2.16 einsetzen [5]:

$$V_Q = \frac{4\pi e|\Psi(0)|^2 + \left(\frac{\partial E_z}{\partial z}\right)_0}{4} \int \rho \left(x^2 + y^2 - \frac{2r^2}{3}\right) d\vec{x} \quad (2.25)$$

$$-\frac{1}{2} \left(\frac{\partial E_z}{\partial z}\right)_0 \int \rho \left(z^2 - \frac{r^2}{3}\right) d\vec{x} \quad (2.26)$$

$$= -\frac{1}{4} \left[ \left(\frac{\partial E_z}{\partial z}\right)_0 + \frac{4\pi e|\Psi(0)|^2}{3} \right] \int \rho(3z^2 - r^2) d\vec{x} \quad (2.27)$$

$$= \frac{V_{zz}}{4} \int \rho(3z^2 - r^2) d\vec{x}. \quad (2.28)$$

Die eckige Klammer in Gleichung 2.27 kann auch geschrieben werden als:

$$-V_{zz} = \left[ \frac{\partial(E_z - E_z(s))}{\partial z} \right]_0. \quad (2.29)$$

Dabei steht  $E_z(s)$  für den elektrischen Feldgradienten der  $s$ -Elektronen am Kernort.  $V_{zz}$  ist dann der elektrische Feldgradient am Kernort ohne den durch die  $s$ -Elektronen hervorgerufenen Anteil.

Das Raumintegral aus Gleichung 2.25 lässt sich für  $A$  Nukleonen auswerten. Für das  $i$ -te Nukleon ist die Ladung entweder  $e$  oder  $0$ , je nachdem, ob es sich um ein Proton oder ein Neutron handelt. Die Wellenfunktion des Nukleons ist dann  $\Psi(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_A)$ . Die Raumladungsdichte des Kerns  $\rho(\vec{x})$  lässt sich dann ausdrücken als:

$$\rho(\vec{x}) = \int \Psi_{jm}^*(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_A) \sum_{i=1}^A e_i \delta(\vec{r}_i - \vec{x}) \Psi_{jm}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_A) d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \dots d\vec{r}_A. \quad (2.30)$$

Die Indizes  $j, m$  stehen dabei für die Quantenzahlen der Drehimpulse und  $e_i$  sei die Ladung des  $i$ -ten Nukleons. Durch den Übergang in Kugelkoordinaten ( $x_i = r_i \sin \theta_i \cos \phi_i$ ;  $y_i = r_i \sin \theta_i \sin \phi_i$ ;  $z_i = r_i \cos \theta_i$ ) ergibt sich:

$$\int \rho(\vec{x})(3z^2 - r^2)d\vec{x} = \int \Psi_{jm}^* \left[ \sum_{i=1}^A e_i r_i^2 (3 \cos^2 \theta_i - 1) \right] \Psi_{jm} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \dots d\vec{r}_A \equiv eQ, \quad (2.31)$$

wobei

$$eQ = \int \Psi_{jj}^* \left[ \sum_{i=1}^A e_i r_i^2 (3 \cos^2 \theta_i - 1) \right] \Psi_{jj} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \dots d\vec{r}_A \quad (2.32)$$

ist. Diese Größe  $Q$  wird als das Quadrupolmoment des Kernes bezeichnet und hat die Dimension einer Fläche, die üblicherweise in barn<sup>3</sup> angegeben wird. Für kugelsymmetrische Kerne ist das Quadrupolmoment Null. Für zigarrenförmige Kerne nimmt das Quadrupolmoment einen positiven und für linsenförmige Kerne einen negativen Wert an. In DFT-Rechnungen wird für den <sup>57</sup>Fe Kern angenommen, dass das Quadrupolmoment 0,16 barn beträgt [8, 9]. Die runde Klammer  $(3 \cos^2 \theta_i - 1)$  aus Gleichung 2.31 ist bis auf einen konstanten Faktor die Kugelfunktion  $Y_{20}(\theta_i)$ . Daher ist die eckige Klammer in Gleichung 2.31 ein sphärischer Tensor der zweiten Stufe, für den das Wigner-Eckart-Theorem gilt [10, 11, 5]:

$$\int \Psi_{j_1 m_1}^* T_{lm} \Psi_{j_2 m_2} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \dots d\vec{r}_A = (-1)^{j_1 - m_1} \begin{pmatrix} j_1 & l & j_2 \\ m_1 & m & m_2 \end{pmatrix} (j_1 || T_l || j_2). \quad (2.33)$$

Der Term  $(j_1 || T_l || j_2)$  ist das reduzierte Matrixelement und unabhängig von der Quantenzahl  $m$ . Die Matrix ist ein Glebsch-Gordan-Koeffizient. Für  $l = 2$  und  $m = 0$  ergibt sich dann

$$\int \Psi_{jm}^* \dots \Psi_{jm} d\vec{r}_1 d\vec{r}_2 \dots d\vec{r}_A = eQ (-1)^{j-m} \frac{\begin{pmatrix} j & 2 & j \\ -m & 0 & m \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} j & 2 & j \\ -j & 0 & j \end{pmatrix}}. \quad (2.34)$$

Dies lässt sich vereinfachen zu:

$$(-1)^{j-m} \frac{\begin{pmatrix} j & 2 & j \\ -m & 0 & m \end{pmatrix}}{\begin{pmatrix} j & 2 & j \\ -j & 0 & j \end{pmatrix}} = \frac{3m^2 - j(j+1)}{3j^2 - j(j+1)}. \quad (2.35)$$

---

<sup>3</sup>1 barn = 1 b = 100 fm<sup>2</sup> = 10<sup>-28</sup> m<sup>2</sup>; Das barn (engl. Scheune) ist keine SI-Einheit, aber gebräuchlich in der Hochenergiephysik als Einheit des Wirkungsquerschnitts.

Für die elektrische Wechselwirkungsenergie des Quadrupoltermes erhält man nach Einsetzen [5]:

$$V_Q = \frac{eQV_{zz}}{4} \frac{3m^2 - j(j+1)}{3j^2 - j(j+1)}. \quad (2.36)$$

Dieser Ausdruck wird erst von Null verschieden, wenn  $j$  mindestens 1 ist. Im Falle des  $^{57}\text{Fe}$ , welches die Zustände  $I_g = \frac{1}{2}$  und  $I_a = \frac{3}{2}$  annehmen kann, ist dies nur für den angeregten Zustand der Fall. Es ergibt sich dann für den Linienabstand im Mössbauerspektrum [5] der Zusammenhang mit der Komponente des elektrischen Feldgradienten:

$$\Delta E_Q = \Delta V_Q = \frac{1}{2} eQV_{zz} = E_\gamma \Delta v. \quad (2.37)$$

Als Konsequenz lässt sich im Absorptionsspektrum eine Dublettstruktur beobachten, welche eine Aufspaltung um  $\Delta v$  zeigt.

### 2.1.3 Elektrischer Feld Gradient (EFG)

Der im vorherigen Unterkapitel eingeführte elektrische Feld Gradient ist der negative Gradient des Potentials  $-\vec{\nabla}V$  einer Ladungsverteilung. Dieser Tensor der 2. Stufe besitzt aufgrund seiner Symmetrie ( $V_{ij} = V_{ji}$ ) nur fünf unabhängige Elemente. Nach Diagonalisierung und Subtraktion der Spur  $\sum_i V_{ii}$  (welche keinen Beitrag zur Energie liefert [12]) ergibt sich der spurlose EFG-Tensor:

$$\overset{\leftrightarrow}{V} = \begin{pmatrix} V_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & V_{yy} & 0 \\ 0 & 0 & V_{zz} \end{pmatrix}. \quad (2.38)$$

Für die Spur gilt nun:

$$\sum_i V_{ii} = 0. \quad (2.39)$$

Mit der Konvention

$$|V_{zz}| \geq |V_{yy}| \geq |V_{xx}| \quad (2.40)$$

ergeben sich nur zwei unabhängige Komponenten des Tensors:  $V_{zz}$  (manchmal auch als  $eq$  geschrieben) und der Asymmetrieparameter  $\eta$ :

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}}. \quad (2.41)$$

Dieser Parameter liegt aufgrund der Konvention 2.40 im Bereich  $0 \leq \eta \leq 1$ . Mit Hilfe des Asymmetrieparameters lässt sich auch die Quadrupolaufspaltung schreiben als:

$$\Delta E_Q = \frac{eQV_{zz}}{2} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right)^{\frac{1}{2}} = \frac{e^2 q Q}{2} \left(1 + \frac{\eta^2}{3}\right)^{\frac{1}{2}}. \quad (2.42)$$

### 2.1.4 Magnetische Hyperfeinwechselwirkung

Herrscht am Ort des Kerns ein äußeres Magnetfeld  $\vec{B}$  und liegt ein inneres magnetisches Kernmoment  $\vec{\mu}_K$  vor, dann tritt der Kern-Zeemann-Effekt in Erscheinung und die Energieniveaus des Kerns spalten weiter auf. Die Wechselwirkungsenergie zwischen  $\vec{B}$  und  $\vec{\mu}_K$  ist dann:

$$E(\vec{B}, \vec{\mu}_K) = -\mu_K B \frac{m}{j}. \quad (2.43)$$

Dabei ist  $j$  die Drehimpulsquantenzahl und  $m$  die Kernspinkomponente in Richtung des Magnetfeldes  $\vec{B}$  (magnetische Quantenzahl). Die Energieniveaus spalten dann in  $2j+1$  verschiedene Niveaus auf, welche die Werte zwischen  $m = -j, -j+1, \dots, j-1, j$  annehmen können. Für den Übergang zwischen den Niveaus gilt die Dipolauswahlregel, so dass nur Übergänge auftreten, bei denen sich die magnetische Quantenzahl  $m$  um entweder 1 oder 0 ändert:  $\Delta m = \pm 1, 0$ . Für  $^{57}\text{Fe}$  spaltet das Grundniveau  $I_g = \frac{1}{2}$  dann in zwei energieäquidistante Subniveaus auf und das angeregte Niveau  $I_a = \frac{3}{2}$  in vier energieäquidistante Subniveaus. Mit der Dipolauswahlregel erhält man daraus sechs verschiedene Übergänge. Für die Position der sechs Linien im Mössbauerspektrum ergibt sich nach [5]:

$$v = \frac{E_\gamma^* - E_\gamma}{E_\gamma} - \frac{\mu_a B m_a}{E_\gamma j_a} + \frac{\mu_g B m_g}{E_\gamma j_g}. \quad (2.44)$$

Dabei sind  $E_\gamma$  und  $E_\gamma^*$  die Übergangsenergien der Quelle und des Absorbers (durch den Stern symbolisiert). Die Linienintensität wird durch die Übergangswahrscheinlichkeit bestimmt, welche durch die Glebsch-Gordan-Koeffizienten bestimmt sind [5] und keine Abhängigkeit von dem äußeren und inneren Magnetfeldern aufweisen. In einer Pulverprobe mit reinem inneren Magnetfeld wird die Intensitätsverteilung  $4 : 3 : 1 : 1 : 3 : 4$  erwartet. Ist ein äußeres Magnetfeld angelegt, welches senkrecht zur  $\gamma$ -Richtung verläuft, ergibt sich eine Intensitätsverteilung von  $3 : 4 : 1 : 1 : 4 : 3$ , während bei parallelem Magnetfeld Intensitäten von  $3 : 0 : 1 : 1 : 0 : 3$  zu erwarten sind.

Zusätzlich zu einem äußeren magnetischen Feld  $\vec{B}$  ist in magnetischen Materialien auch ein internes magnetisches Feld  $\vec{B}_{hf}$ , welches als Hyperfeinfeld bezeichnet wird und durch mehrere Beiträge entsteht [13]:

$$\vec{B}_{hf} = \vec{B}_{fc} + \vec{B}_{ls} + \vec{B}_{dd} + B_{latt} \pm \vec{B}. \quad (2.45)$$

Dabei ist  $\vec{B}_{fc}$  der Fermi Kontakt Term, welcher durch die Kernpolarisation der s-Elektronendichte am Kern verursacht wird.  $\vec{B}_{ls}$  ist verursacht durch die Spin-Bahn Kopplung und  $\vec{B}_{dd}$  wird hervorgerufen durch die Dipolwechselwirkung der Elektronenhülle. Die Wechselwirkung der Elektronen mit dem Kristallgitter liefert den Beitrag  $B_{latt}$ . Das Vorzeichen der Kopplung des externen Feldes wird durch parallele, bzw. antiparallele Kopplung verursacht.

### 2.1.5 Quadratischer Dopplereffekt

Die in einem Mössbauerspektrum gemessene Isomerieverschiebung  $\delta_{gesamt}$  setzt sich aus der Isomerieverschiebung  $\delta$  und dem temperaturabhängigen Term  $\delta_T$  zusammen. Der temperaturabhängige Term wird durch

$$\delta_T = -\frac{K'}{2M'c^2} \langle r^2 \rangle \quad (2.46)$$

beschrieben. Dabei ist  $K'$  die Federkonstante des harmonischen Oszillators, der die Schwingung des Kerns um seine Nulllage beschreibt. Für die gesamte temperaturabhängige Isomerieverschiebung ergibt sich damit:

$$\delta_{gesamt,T} = \delta + \delta_T \quad (2.47)$$

Die temperaturabhängige Isomerieverschiebung  $\delta_T$  ist immer negativ und verringert die gemessene Isomerieverschiebung bei höheren Temperaturen [1].

### 2.1.6 Debye-Waller-Faktor

Wird von einem Atom in einem Kristallgitter Energie absorbiert, so kann dies ohne Energieverlust stattfinden, wenn der gesamte Kristall den Impuls aufnimmt. Dadurch wird die resonante Absorption ermöglicht. Als Debye-Waller-Faktor oder auch als Lamb-Mössbauer-Faktor wird der Anteil der rückstoßfreien  $\gamma$ -Quanten bezeichnet [12, 5]:

$$f^*(T) = \exp \left( -\frac{\hbar^2 k^2}{2M'} \frac{3}{2k_B \Theta} \left[ 1 + \frac{2\pi^2}{3} \left( \frac{T}{\Theta} \right)^2 \right] \right) = \exp(-k^2 \langle x^2 \rangle). \quad (2.48)$$

Mit  $M'$  als Masse des Atoms und  $\Theta$  als Debyetemperatur.  $\langle x^2 \rangle$  stellt das mittlere Auslenkungsquadrat des Kerns in Ausbreitungsrichtung des  $\gamma$ -Quants dar und  $k$  sei der Betrag des Wellenzahlvektors des  $\gamma$ -Quants.  $T$  ist die Temperatur.

### 2.1.7 Spin-Relaxation

Werden in einem System Energie und Spin in einem Zeitfenster transferiert, welches kürzer ist als das Zeitfenster für den Mössbauereffekt, so wird nicht ein bestimmter Zustand durch die Mössbauerspektroskopie beobachtet, sondern eine Überlagerung der beteiligten Zustände. Dies kann in vielfältiger Weise geschehen und ist ausführlich in [14] und [15] beschrieben.

## 2.2 Magnetische Nanoteilchen

Für magnetische Teilchen existiert eine kritische Größe unterhalb der sie nur noch als eindomänige Teilchen (SD<sup>4</sup>) existieren [16]. Diese liegt für die meisten magnetischen Materialien typischerweise im Bereich einiger 10 nm. Die Richtung dieser magnetischen Domäne ist dabei z.B. abhängig von der Kristallstruktur innerhalb der Nanoteilchen, von den Kräften die auf das Teilchen wirken oder auch von der Form der Teilchen. Die Energieverschiebung, welche diese Änderungen bewirkt, wird als magnetische Anisotropie bezeichnet [17]. In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen Arten der Anisotropie im Falle von magnetischen Nanoteilchen sowie ihre Auswirkung auf die Mössbauerspektroskopie beschrieben.

### 2.2.1 Kristall-Anisotropie

In einem Kristall ergeben sich ein oder mehrere Richtungen in denen die Kristall-Anisotropie besonders niedrig ist. Solche Richtungen werden als Vorzugsrichtungen der Magnetisierung (weiche Richtungen<sup>5</sup>) bezeichnet. Die Anisotropie Energie ergibt sich im Falle eines kubischen Kristalls beispielsweise aus:

$$E^{kubisch} = K_0 + K_1(\alpha_1^2\alpha_2^2 + \alpha_2^2\alpha_3^2 + \alpha_3^2\alpha_1^2) + K_2(\alpha_1^2\alpha_2^2\alpha_3^2) + \dots \quad (2.49)$$

Die  $K_{0,1,2,\dots}$  sind dabei temperaturabhängige Materialkonstanten und die  $\alpha_{1,2,3}$  beschreiben den Kosinus der Winkel zwischen den Spin Richtungen und den drei Kristallachsen.

### 2.2.2 Stress-Anisotropie

Bildet sich ein Teilchen im Magnetfeld aus, so erleidet dieses eine Kontraktion durch das Magnetfeld und damit eine Formveränderung. Wirkt nun ein äußerer Druck ( $\sigma$  in Kraft pro Fläche) auf die Oberfläche des Teilchens, so verändert sich auch die Energie der Stress-Anisotropie [17]:

$$E^{Streß} = -\frac{3}{2}\lambda\sigma \cos^2 \theta. \quad (2.50)$$

Der Winkel  $\theta$  ist zwischen dem Spin und der Richtung der Kraft gegeben.  $\lambda$  ist eine Materialkonstante, welche für verschiedene Kristallrichtungen unterschiedliche Werte annehmen kann. Im Fall von kubischen Kristallen unterscheiden sich diese nicht.

---

<sup>4</sup>SD: single domain

<sup>5</sup>easy axis of magnetisation

### 2.2.3 Interaktions-Anisotropie

Das von einem magnetischem Moment hervorgerufene Vektorpotential  $\vec{A}$  lässt sich aus dem Biot-Savart-Gesetz ableiten [11, 18, 19, 20], wenn es in eine Taylor-Reihe entwickelt wird:

$$\vec{A}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \int dV' \vec{j}(\vec{r}') \left( \frac{1}{r} + \vec{r}' \cdot \vec{\nabla}' \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} + \dots \right). \quad (2.51)$$

Dabei ist  $\vec{j}$  die Stromdichte. Der erste Term der Entwicklung verschwindet [11, 18]. Für die Stromverteilung  $\vec{j}$  gilt:

$$\int dV' \vec{j}' \vec{r}' \cdot \vec{\nabla}' \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \simeq \vec{\mu}' \times \frac{\vec{r}}{r^3}. \quad (2.52)$$

Damit ergibt sich das Vektorpotential zu:

$$\vec{A}(\vec{r}) = -\frac{\mu_0}{4\pi} \vec{\mu}' \times \vec{\nabla}' \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} = \frac{\mu_0}{4\pi} \vec{\nabla}' \times \frac{\vec{\mu}'}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \quad (2.53)$$

und daraus das von dem magnetischen Moment  $\vec{\mu}$  erzeugte Magnetfeld [11, 18, 19, 20] (unter Vernachlässigung des Hyperfeinwechselwirkungstermes [19]):

$$\vec{B}(\vec{r}) = \vec{\nabla} \times \vec{A}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[ (\vec{\mu}' \cdot \vec{\nabla}) \vec{\nabla} \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \right]. \quad (2.54)$$

Die potentielle Energie eines magnetischen Momentes im Magnetfeld ergibt sich aus:

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}. \quad (2.55)$$

Durch Einsetzen von 2.54 in 2.55 ergibt sich:

$$E = \frac{\mu_0}{4\pi} \left[ (\vec{\mu} \cdot \vec{\nabla}) (\vec{\mu}' \cdot \vec{\nabla}') \frac{1}{|\vec{r} - \vec{r}'|} \right] \quad (2.56)$$

$$= \frac{\mu_0}{4\pi} \left[ \frac{\vec{\mu} \cdot \vec{\mu}' - 3(\vec{\mu} \cdot \hat{r})(\vec{\mu}' \cdot \hat{r})}{|\vec{r} - \vec{r}'|^3} \right], \quad (2.57)$$

$\hat{r}$  ist dabei  $\frac{\vec{r} - \vec{r}'}{|\vec{r} - \vec{r}'|}$ . Werden neben diesen beiden Teilchen weitere betrachtet, so ändert sich die Energie zu:

$$E = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i>j} \left[ \frac{\vec{\mu}_i \cdot \vec{\mu}_j}{r_{ij}^3} - \frac{3(\vec{\mu}_i \cdot \vec{r}_{ij})(\vec{\mu}_j \cdot \vec{r}_{ij})}{r_{ij}^5} \right]. \quad (2.58)$$

Dabei ist  $\mu_{i,j}$  das magnetische Moment des i-ten (j-ten) Teilchens und  $\vec{r}_{ij}$  der Vektor, der das i-te und j-te Teilchen verbindet.  $\mu_0$  ist die Permeabilitätskonstante.

Als Konsequenz ist die magnetische Energie abhängig von der räumlichen Anordnung der magnetischen Momente.

### 2.2.4 Form-Anisotropie

Auch die Form der Teilchen führt zu einer Änderung der Anisotropie. Wenn der Spin des Teilchens sich dreht, so wandern die Feldlinien über die Oberfläche und erfahren bei anderer als Kugelform eine Energieverschiebung durch Änderung der Demagnetisierungsenergie im Inneren des Teilchens.

Für ein elliptisches Partikel mit der Hauptachse  $c$  und der Nebenachse  $a$  ist die magnetostatische Energie  $E^{Form}$  gegeben durch:

$$E_{Ellipsoid}^{Form} = \frac{1}{2} M_s^2 (N_a - N_c) \sin^2 \theta. \quad (2.59)$$

$M_s$  ist die Magnetisierung (magnetisches Moment  $\vec{m}$  pro Einheitsvolumen) und  $N_{a,c}$  die materialspezifischen Demagnetisierungskoeffizienten entlang der  $a$  und  $c$ -Achsen.  $\theta$  repräsentiert den Winkel zwischen der Spin Richtung und der  $c$ -Achse. Im Falle, dass das Partikel Kugelform annimmt, verschwindet die Differenz  $N_a - N_c$  und die Form-Anisotropie wird Null. In der Regel entspricht die Hauptachse  $c$  der Vorzugsrichtung der Magnetisierung.

### 2.2.5 Fluktuationen der Magnetisierungsrichtung

Für kleine Teilchen (in der Größenordnung von einigen Nanometern) kann die thermische Energie  $E_T = k_B T$  vergleichbar werden mit der Anisotropiebarriere  $E^{Ani}$ . Dann ist die Vorzugsrichtung der Magnetisierung nicht mehr zwingend die Richtung des Magnetisierungsvektors. Der Spin des Teilchens beginnt um die Vorzugsrichtung zu fluktuieren. Dieses Phänomen wird meist kollektive magnetische Anregung genannt und geht über in die superparamagnetische Relaxation, wenn der Spin beginnt zwischen verschiedenen Vorzugsrichtungen zu fluktuieren.

Wenn die Zeitskala der experimentellen Methode groß ist im Vergleich zur Zeitkonstante der superparamagnetischen Relaxation, dann verhält sich die Probe wie ein Paramagnet. Für die Teilchen lässt sich deshalb die Blocking Temperatur  $T_B$  definieren, unterhalb der sie sich wie geordnete magnetische Kristalle verhalten.

Für ein uniaxiales Teilchen, dessen magnetische Anisotropieenergie  $E$  gegeben ist durch [17]:

$$E(\theta) = KV \sin^2 \theta, \quad (2.60)$$

mit  $K$  als Energie Anisotropie Konstante,  $V$  als dem Teilchen Volumen und  $\theta$  als dem Winkel zwischen der Richtung der Magnetisierung  $\vec{M}$  und der Vorzugsrichtung der Magnetisierung. Diese Gleichung hat je ein Minimum um  $\theta = 0$  und  $\theta = \pi$ . Ist zusätzlich ein externes magnetisches Feld  $\vec{B}$  entlang der Symmetrieachse vorhanden, so ergibt sich die Energie zu (siehe Abb. 2.1):

$$E(\theta) = KV \sin^2 \theta - BM_S V \cos \theta. \quad (2.61)$$

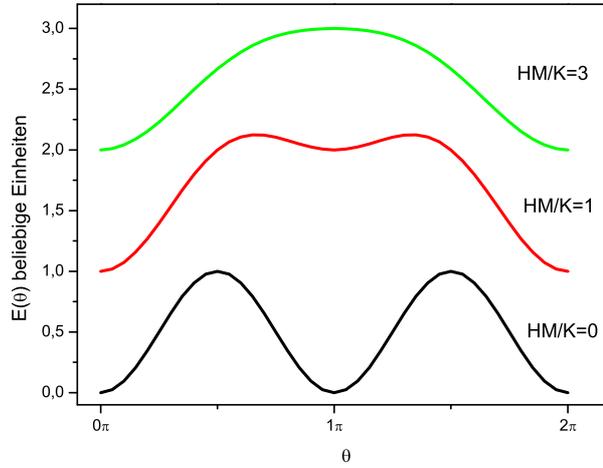


Abbildung 2.1: Magnetische Energie von Nanoteilchen im Magnetfeld  
 Die drei Kurven geben den Verlauf der magnetischen Energie für verschiedener Verhältnisse von  $BM/K$  wieder, wie sie durch Gleichung 2.61 beschrieben werden.

Néel [21] zeigte, dass die thermische Energie  $E_T$  eine Wahrscheinlichkeitsdichte  $f(\theta)$  verursacht, den Magnetisierungsvektor  $\vec{M}$  im Winkelsegment zwischen  $\theta$  und  $\theta + d\theta$  zu finden:

$$f(\theta)d\theta = \frac{\exp\left[\frac{-E(\theta)}{k_B T}\right] \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi \exp\left[\frac{-E(\theta)}{k_B T}\right] \sin \theta d\theta}. \quad (2.62)$$

Tritt superparamagnetische Relaxation auf, so lässt sich die Relaxationszeit nach Néel bestimmen (ohne externes Feld  $B$ ),

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right), \quad (2.63)$$

wobei  $\tau_0$  im Bereich von  $10^{-9}$  bis  $10^{-11}$  s liegt. In Anwesenheit eines externen Feldes  $B$  hat Brown [22, 23] die Gleichung 2.63 verallgemeinert und findet für die beiden Minima zwei unterschiedliche Relaxationszeiten  $\tau_{1 \rightarrow 2, 2 \rightarrow 1}$ :

$$\left. \begin{array}{l} \tau_{1 \rightarrow 2} \\ \tau_{2 \rightarrow 1} \end{array} \right\} = \frac{M_S \pi^{\frac{1}{2}}}{K \gamma_0} \alpha'^{-\frac{1}{2}} (1 - h'^2)^{-1} (1 \pm h')^{-1} \exp[\alpha'(1 \pm h')^2] \quad (2.64)$$

mit  $h' = \frac{BM_S}{2K}$  und  $\alpha' = \frac{KV}{k_B T}$ .  $\gamma_0$  ist das gyromagnetische Verhältnis. Die Wahrschein-

lichkeit den Magnetisierungsvektor in den Minima 1 und 2 zu finden ist:

$$p_{1,2} = \frac{\tau_{2 \rightarrow 1, 1 \rightarrow 2}}{\tau_{2 \rightarrow 1} + \tau_{1 \rightarrow 2}}. \quad (2.65)$$

Im Falle von  $B = 0$  reduziert sich die Gleichung 2.64 zu:

$$\left. \begin{array}{l} \tau_{1 \rightarrow 2} \\ \tau_{2 \rightarrow 1} \end{array} \right\} = \frac{M_s \pi^{\frac{1}{2}}}{K \gamma_0} \left( \frac{KV}{k_B T} \right)^{-\frac{1}{2}} \exp \left[ \frac{KV}{k_B T} \right]. \quad (2.66)$$

Die Relaxationszeiten  $\tau_{2 \rightarrow 1, 1 \rightarrow 2}$  ( $B \neq 0$ ) werden häufig zu einem einzigen Parameter  $\tau_{rel}$  zusammengefasst:

$$\frac{1}{\tau_{rel}} = \frac{1}{\tau_{2 \rightarrow 1}} + \frac{1}{\tau_{1 \rightarrow 2}}. \quad (2.67)$$

Die Magnetisierung  $M$  kann gemittelt über Zeiten, die groß sind im Vergleich zu  $\tau$ , angegeben werden als (aus Gleichung 2.62):

$$\langle M \rangle = M_S \frac{\int_0^\pi \exp \left[ -\frac{E(\theta)}{k_B T} \right] \cos \theta \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi \exp \left[ -\frac{E(\theta)}{k_B T} \right] \sin \theta d\theta}. \quad (2.68)$$

Dabei ist  $E(\theta)$  die Energie aus Gleichung 2.61 und  $M_S$  die Sättigungsmagnetisierung. Diese Gleichung vereinfacht sich im Fall vernachlässigbarer Anisotropie zu [17]:

$$\langle M \rangle = M_S \mathbb{L} \left( \frac{\mu B}{k_B T} \right). \quad (2.69)$$

$\mathbb{L}$  symbolisiert dabei die Langevin-Funktion [20]:

$$\mathbb{L}(x) = \coth(x) - \frac{1}{x} \quad (2.70)$$

und

$$\mu = MV \quad (2.71)$$

das magnetische Moment des Teilchens. Ist die Anisotropie nicht vernachlässigbar, kann die von West [24] gefundene Gleichung verwendet werden

$$M = a^{-\frac{1}{2}} [\exp(b)y(\alpha_1) + \exp(-b)y(\alpha_2)]^{-1} \sinh(b) - \frac{b}{2a}, \quad (2.72)$$

mit

$$\alpha_1 = \left( \frac{1+b}{2a} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.73)$$

$$\alpha_2 = \left( \frac{1-b}{2a} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2.74)$$

$$a = \frac{KV}{k_B T} \quad (2.75)$$

$$b = \frac{\mu B}{k_B T} \quad (2.76)$$

$$y(x) = \exp(-x^2) \int_0^x \exp(t^2) dt. \quad (2.77)$$

Ist kein magnetisches Feld angelegt, so ergeben obige Gleichungen eine Magnetisierung von Null. Dies ist aber nur zutreffend, wenn die superparamagnetische Relaxationszeit klein ist im Vergleich zur Beobachtungszeit. Ist die Relaxationszeit groß, so wird eine verbleibende Magnetisierung gemessen:

$$M(V, T) = M(T) \langle \cos \theta \rangle \quad (2.78)$$

mit den von Mørup und Topsøe [25] gefundenen:

$$\langle \cos \theta \rangle = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \exp\left[-\frac{1}{\beta} \sin^2 \theta\right] \cos \theta \sin \theta d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \exp\left[-\frac{1}{\beta} \sin^2 \theta\right] \sin \theta d\theta} \quad (2.79)$$

$$= \frac{\beta^{\frac{1}{2}} \exp\left[\frac{1}{\beta}\right] - 1}{2 \int_0^{\beta-\frac{1}{2}} \exp[x^2] dx}, \quad (2.80)$$

mit  $\frac{k_B T}{KV} = \beta$ . Für kleine Temperaturen  $\frac{KV}{k_B T} \gg 1$  wird dies zu:

$$\langle \cos \theta \rangle \simeq 1 - \frac{k_B T}{2KV}. \quad (2.81)$$

Im Fall, dass die Korrelationszeit für kollektive magnetische Anregungen klein ist im Vergleich zur Beobachtungszeit, lässt sich ein Einfluss auf die magnetische Aufspaltung im Mössbauerspektrum beobachten:

$$B_{hf}(V, T) = B_{hf}(\infty, T) \langle \cos \theta \rangle. \quad (2.82)$$

Für kleine Teilchen wird demnach eine geringe Aufspaltung erwartet. Liegt zusätzlich ein magnetisches Feld an, so ergibt sich:

$$B_{hf}(V, T, B) = B + B_{hf}(\infty, T) \mathbf{L} \left( \frac{\mu B}{k_B T} \right). \quad (2.83)$$

## 2.2.6 Demagnetisierungsfeld

In magnetischen Partikeln, in denen ein magnetisches Moment auftritt, werden auf der Oberfläche magnetische Pole gebildet, welche zu einem Demagnetisierungsfeld innerhalb der Probe beitragen [17, 26]. Dieses Feld addiert sich zum Hyperfeinfeld am Kernort und trägt damit zur Aufspaltung im Mössbauerspektrum bei. Dieses Phänomen tritt unter anderem auch bei eindomänigen Partikeln auf und lässt sich durch

$$B = -NM_s \quad (2.84)$$

beschreiben.  $N$  ist der Demagnetisierungskoeffizient und ergibt sich für kugelförmige Partikel als

$$N = \frac{1}{3}. \quad (2.85)$$

## 2.3 Material

### 2.3.1 Aufbau des Mössbauerspektrometers

Für die Messungen der Mössbauerspektren standen zwei Badkryostaten (Oxford Instruments,  $\sim 2 - 350$  K), ausgestattet entweder mit einem Permanentmagneten der ein Feld von 0,02 T erlaubt oder einem Elektromagneten, der Felder bis 0,2 T bereitstellt, zur Verfügung. Die magnetischen Felder sind in beiden Fällen senkrecht zur Achse der  $\gamma$ -Strahlung angeordnet. Zwei Durchflusskryostaten (CF 500, Oxford Instruments, 77 – 350 K) waren für Messungen ohne magnetische Felder verfügbar, ferner ein Badkryostat (Oxford Instruments, 4,2 – 300 K, max. 8 T) mit einem supraleitenden Magnetsystem, welches sowohl parallel als auch senkrecht zur Strahlachse orientiert werden konnte. Die Temperatur war an allen Messplätzen variabel einstellbar (ITC 4, Oxford Instruments). Die Genauigkeit der Temperaturkontrolle betrug  $\pm 0,1$  K. Die Proben wurden als gefrorene Lösungen in zylindrischen Delrintöpfchen gemessen. Die Quellen aus  $^{57}\text{Co}$  (Amersham Buchler) waren in eine  $6\ \mu\text{m}$  Rhodium Matrix eingebettet. Ihre Aktivität lag zwischen 0,5 – 1,85 GBq und sie waren in jeden Aufbau austauschbar integrierbar. Die Messapparatur war in Transmissionsgeometrie aufgebaut. Die Quelle saß auf den frei schwingenden Membranen des Antriebes, welche durch eine Dreiecksspannung in periodischer, konstanter Beschleunigung bewegt wurde. Der Detektor bestand aus einem zylindrischen Rohr mit 10 cm Durchmesser und 30 cm Länge, welches mit einem Argon-Methan Gemisch (90 % Argon zu 10 % Methan) gefüllt war. Die Probe wurde unbeweglich in einem temperaturgeregelten Kryostaten in den Strahlengang gebracht. Die Impulse des Zählrohres wurden mit einem Vor- und einem Hauptverstärker verstärkt und mit einem Multikanalanalysator aufgenommen. Ein Diskriminator erlaubte die Auswahl des 14,4 keV Bereiches des Mössbauerüberganges. Zur weiteren Analyse wurden die Spektren auf einen Computer übertragen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Microsoft Office-

Programm Excel 2003, dem in Excel integrierten Solver und dem Makropaket Vinda von Haraldur Gunnerlaugson [27].

### **2.3.2 Rechencluster**

Für die DFT Rechnungen stand der Cluster des Instituts für Physik der Universität zu Lübeck zur Verfügung. Als Programmpakete kamen die Programme Gaussian03 [28] und ORCA [9] zur Anwendung. Für die Erstellung der Protein- und Molekül-Modelle wurde das Programm Chem3D Pro 7.0 verwendet. Die Darstellungen der Proteine und der Proteinoberflächen erfolgte mit dem Programm PyMol.



# 3 Magnetospirillum gryphiswaldense

## 3.1 Einleitung

### 3.1.1 Magnetotaktische Bakterien

Im Jahre 1975 veröffentlichte Blakemore [29] die Entdeckung von im Wasser lebenden Bakterien, welche in der Lage sind Magnetfelder zu erspüren, ihre Bewegung an den Magnetfeldlinien der Erde auszurichten und sich entlang dieser zu bewegen. Die Erdmagnetfeldlinien sind auf der Nordhalbkugel umso stärker abwärts gerichtet, je näher man dem Pol kommt. Die von Blakemore entdeckten Bakterien aus den Cape Cod Salzmarschen in Massachusetts wanderten in Richtung des magnetischen Nordpols<sup>1</sup>.

Die Bakterien versuchen dabei eine bestimmte Sedimentschicht zu erreichen. Die Feldlinien des Erdmagnetfeldes treten fast überall auf der Erde aus dem Boden und ermöglichen mit einer Bewegung entlang dieser Linien eine gezielte Aufwärts- oder Abwärtsbewegung. Neben diesen nordsuchenden Bakterien wurden auch südsuchende Bakterien in der südlichen Hemisphäre gefunden [30] und auch eine Gleichverteilung von süd- und nordsuchenden Bakterien am Äquator [31]. Kürzlich berichteten Simmons *et al.* auch über südsuchende Bakterien in der nördlichen Hemisphäre [32]. Der Lebensraum dieser Bakterien ist die Übergangszone zwischen aeroben und anaeroben Sedimentschichten in Salzwassermarschen und Süßwassersedimenten [29, 30, 33]. In dieser Zone kann eine erhöhte Population dieser Bakterien gefunden werden [34], so dass eine reine Magnetotaxis nicht anzunehmen ist, denn die Bakterien wandern nicht weiter, wenn sie bereits einen optimalen O<sub>2</sub>-Partialdruck erreicht haben. Deshalb wird heutzutage eher von einer Magneto-Aerotaxis gesprochen [35, 36].

Alle bisher beschriebenen magnetotaktischen Bakterien sind Gram-negative prokaryontische Bakterien in verschiedensten Morphologien: Stäbchen (rod), Kokken (cocci), Schraubenartige (spirilli) oder auch Vielzellige [37]. Sie besitzen Geißeln [36] zur Fortbewegung. In allen magnetotaktischen Bakterien wurden eisenhaltige Einschlüsse gefunden, die in Ketten angeordnet sind. Diese Einschlüsse werden Magnetosomen [38] genannt und sind reine Einkristalle [39]. Sie bestehen meist aus dem Eisenoxid Magnetit [33] oder den Eisensulfiden Greigit und Eisenpyrit [40, 41]. Es sind aber

---

<sup>1</sup>nordsuchende Bakterien: Bakterien, welche in einem Wassertropfen in Richtung des magnetischen Nordpols wandern.

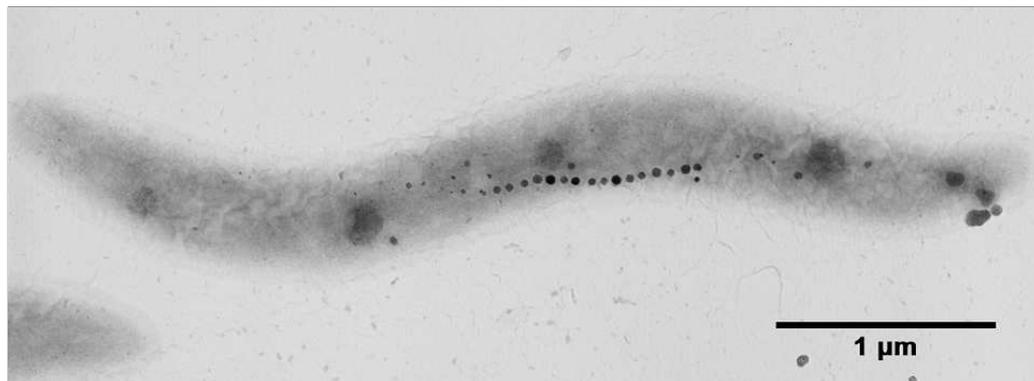


Abbildung 3.1: *M. gryphiswaldense* im ausgewachsenen Stadium.

auch andere Kristalle bekannt, wie beispielsweise Mackinawit<sup>2</sup> [42] oder auch Bakterien, die sowohl Eisenoxide als auch Eisensulfide produzieren [43, 34]. Die Magnetosomen machen von der Trockenmasse der Bakterien circa 2,0 bis 3,8 Gewichtsprozent aus [44, 45, 46]. Diese Einkristalle haben typischerweise eine Größe von 35 nm bis 120 nm [36] und liegen damit im Limit für eindomänige permanente Nano-Magnete [16, 17]. Jedes Magnetosom ist für sich selbst von einer 2 – 3 nm dicken proteinhaltigen Lipiddoppelschicht umgeben [47] und durch eine Filamentstruktur [48] in einer Kette aufgereiht [49].

Die Aufreihung der Magnetosomen bewirkt, dass sich ihre permanenten magnetischen Dipolmomente zu einem Gesamtdipol addieren [50], dessen Dipolmoment groß genug ist, um die Bakterien gegen die Kräfte aus der thermischen Bewegung auszurichten [51, 52, 35]. Die Ausrichtung der Bakterien schränkt ihre Bewegungsfreiheit auf eine Dimension entlang der Feldlinien ein und ermöglicht ihnen somit auf einfache Weise ideale Lebensbedingungen zu finden [30].

Diese Lebensbedingungen entscheiden auch über die Entstehung der Magnetosomen. Oberhalb eines O<sub>2</sub>-Partialdrucks von 20 mbar kann das Bakterium keine Magnetosomen mehr bilden und erst unterhalb eines O<sub>2</sub>-Partialdrucks von 0,25 mbar wird optimales Wachstum beobachtet [53].

In magnetotaktischen Bakterien werden enorme Mengen Eisen akkumuliert (sie liegt circa beim 300 – 400-fachen des Gehalts von *E. coli*). Die Aufnahme von Fe<sup>3+</sup>-Ionen in Bakterien erfolgt gewöhnlich über die Bildung von sogenannten Siderophoren [54, 55, 56]. Dies sind niedermolekulare Substanzen (< 1 kDa), welche die Bakterien produzieren und an die Umwelt abgeben. Diese Chelatoren binden Fe<sup>3+</sup>-Ionen und bringen es in eine lösliche Form. Fe<sup>3+</sup>-Siderophore werden durch Rezeptoren in der äußeren Membran (gram-negative Bakterien) bzw. auf der Zelloberfläche (gram-positive Bakterien) selektiv erkannt und dann mittels eines komplexen Apparates von

---

<sup>2</sup>Mackinawit: Fe<sub>0,75</sub><sup>2+</sup>Ni<sub>0,25</sub>S<sub>0,9</sub>

Transportproteinen durch die Membran(en) geschleust [57]. Intrazellulär erfolgt enzymatisch eine reduktive Dekomplexierung [58]. Während z. B. in *M. magneticum* Eisentransporter vorhanden sind [59] und  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexbildner des Hydroxamat- und Catecholtyps gefunden wurden [60], ließen sich bislang in *M. gryphiswaldense* weder spezifische Transportsysteme noch Siderophore nachweisen [61, 36]. Die Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$  in *M. gryphiswaldense* erfolgt allerdings in Form einer Michaelis-Menten-Kinetik und ist energieabhängig.

Studien mit radioaktivem Sauerstoff zeigten darüber hinaus, dass der Prozess der Magnetosombildung zwar abhängig vom  $\text{O}_2$ -Partialdruck ist, aber molekularer Sauerstoff nicht im Magnetit angereichert wird [62]. Der Sauerstoff des Magnetit stammt aus Wassermolekülen.

Die die Magnetosomen umgebende Membran besteht aus einer doppelagigen Lipidschicht und weist eine ähnliche Proteinzusammensetzung wie die der Cytoplasmamembran auf [47]. Es liegt damit nahe, dass es sich bei den Vesikeln um Einstülpungen der Cytoplasmamembran handelt. Dafür spricht auch, dass die Magnetosomen in bildgebenden Verfahren (Elektronenmikroskopie -EM-) sehr häufig in der Nähe der Cytoplasmamembran verankert scheinen. Allerdings fehlt dafür bis heute der direkte Beweis [36]. Heutzutage wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Magnetosom-vesikeln um abgetrennte Einstülpungen handelt, wobei sich dann die Frage stellt, in welcher zeitlichen Abfolge sich die Abtrennungen (bzw. Einstülpungen) und die Bildung der Magnetosomen vollziehen.

Damit die Magnetosomen auch weiter wachsen können, müssen sie entweder über einen noch nicht zu Magnetit umgewandelten Eisenvorrat verfügen, oder zu späteren Zeiten das Eisen von außen zugeführt bekommen. Dazu wäre ein intrazelluläres Eisentransportsystem notwendig, welches das Eisen in die Vesikel transportiert. Zwei solcher möglichen Proteine konnten in einer nichtmagnetischen Mutante ausgemacht werden. Die Gene  $\Delta\text{mamB}$  und  $\Delta\text{mamM}$  kodieren zwei Proteine, die zu einer Gruppe von Metall-Transport-Proteinen gehören [63]. Es ist unbekannt, ob es vor der Bildung von Magnetosomen zur Ausbildung einer Vorstufe (Precursor) kommt. Eisenaufnahmeexperimente von  $\text{Fe}^{3+}$  zeigten keine nennenswerte Verzögerung bei der Bildung der Magnetosomen [64] und sprechen damit gegen eine Anhäufung von Vorstufen in den Bakterien und eher für einen direkten Einbau des Eisens in die Magnetosome.

Die Magnetosome sind durch eine Filamentstruktur im Bakterium linear verbunden, welche diese räumlich fest mit der Membran verbinden. Scheffel *et al.* [48] konnten erstmals eine solche Ultrastruktur in Bakterien und speziell in magnetotaktischen Bakterien nachweisen.

### 3.1.2 Magnetit $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Die Struktur von Magnetit ist inversspinell und basiert auf einer flächenzentrierten kubischen Einheitszelle [65] aus 32  $\text{O}^{2-}$  Ionen, 8  $\text{Fe}^{2+}$  und 16  $\text{Fe}^{3+}$  Ionen mit der Summenformel  $\text{Fe}^{3+}[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$  [66]. Die in den Klammern angegebenen Ionen

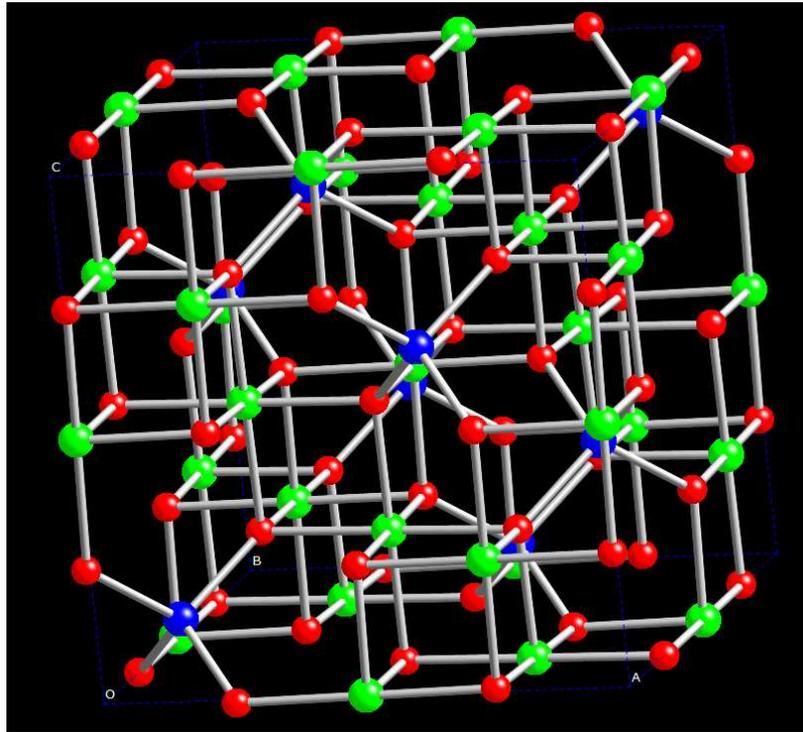


Abbildung 3.2: Kristallstruktur von Magnetit

Der Sauerstoff ist rot, das Eisen auf tetraedischen Kristallplätzen blau und auf oktaedrischen Kristallplätzen grün dargestellt.

besetzen dabei oktaedrische, die anderen tetraedrische Gitterplätze. Magnetit besitzt die Raumgruppe  $Fd\bar{3}m$ , eine Gitterkonstante von  $x_{a,b,c} = 8,394 \text{ \AA}$  und enthält insgesamt 56 Atome in einer Einheitszelle. Die durchschnittliche Dichte liegt bei  $\rho = 5,1 - 5,2 \text{ gcm}^{-3}$ , die Curie-Temperatur bei  $T_C = 850 \text{ K}$  [67]. Magnetit zeigt sich bei Raumtemperatur ferrimagnetisch mit einem magnetischen Moment pro Masse von  $\sigma_s = 90 - 92 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$  [68]. Die beiden Untergitter von Magnetit (A und B Plätze) koppeln antiferromagnetisch. In dem A Untergitter (Tetraeder,  $\text{Fe}^{3+}$ ) haben die Eisenionen einen Spin von  $S_A = \frac{5}{2}$ . Im B Untergitter (Oktaeder,  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Fe}^{2+}$ ) koppeln die beiden Spins der Eisenionen  $S_B^{III} + S_B^{II} = \frac{5}{2} + 2 = \frac{9}{2}$ . Die Spins der Eisenionen in den beiden Untergittern sind antiparallel ausgerichtet und ergeben einen Gesamtspin von  $S_{A+B} = 2$ . Dies ist auch der Grund für den natürlichen Magnetismus von Magnetit in Gesteinen.

In der Natur existiert häufig eine nicht vollständige Form von Magnetit, welches nicht das stöchiometrische Verhältnis von 1:2 zwischen den verschiedenen Ionen aufweist. Die fehlenden Ionen sind dann häufig durch Titan, Mangan oder Zink ersetzt oder sind als Leerstellen im Kristall vorhanden.

Die oktaedrischen Plätze teilen sich jeweils ein Elektron und erscheinen damit als  $\text{Fe}^{2,5+}$  Ionen. Wird Magnetit abgekühlt, so friert diese dynamische Elektronendelokalisierung aus und es ergibt sich ein Übergang in eine zufällige Verteilung bei der Verwey-Temperatur ( $T_V \approx 118 \text{ K}$ ), unterhalb der sich Magnetit von einem schlechten Leiter in einen Isolator wandelt. Bei Raumtemperatur weist Magnetit, begründet durch seine asymmetrische Spinstruktur  $\text{Fe}^{3+} \downarrow [\text{Fe}^{3+} \uparrow \text{Fe}^{2+} \uparrow] \text{O}_4$ , Ferrimagnetismus auf. Ist das Magnetit als Nanopartikel mit wenigen Nanometern Größe vorhanden, so zeigen diese Partikel im Mössbauerspektrum asymmetrische Linien, welche durch eine Größenverteilung der Partikel entsteht. Diese Größenverteilung beeinflusst direkt die in der Mössbauerspektroskopie gemessene Hyperfeinaufspaltung  $B_{hf}$  [17]:

$$B_{hf} = B_0 \left( 1 - \frac{k_B T}{2KV} \right). \quad (3.1)$$

Dabei steht  $K$  für die Anisotropieenergiekonstante,  $V$  für das Volumen eines einzelnen Teilchens,  $B_0$  für das Hyperfeinfeld eines ausgedehnten Kristalls und  $T$  für die Temperatur. Eine Verminderung der Anisotropieenergiekonstante oder des Volumens bedingen somit direkt eine Reduktion des beobachtbaren Hyperfeinfeldes. Bei sehr kleinen Partikeln ( $\sim 6 \text{ nm}$ ) zeigt sich dies als vollständige superparamagnetische Relaxation, bei der ein zentral verbreiteter Peak entsteht [15].

Die Debye-Temperaturen für die beiden unterschiedlichen Plätze sind:  $\Theta_A = 334 \pm 10 \text{ K}$  und  $\Theta_B = 314 \pm 10 \text{ K}$  [69]. Diese unterschiedlichen Debye-Temperaturen bedingen, dass das Verhältnis des  $f^*$ -Faktors bei Raumtemperatur ungleich 1 ist:  $f_B^*/f_A^* = 0,94$ . Dies beeinflusst das Verhältnis der in der Mössbauerspektroskopie gemessenen Besetzungen der Magnetitplätze.

Im Bereich zwischen der Verwey- und der Curie-Temperatur lässt sich Magnetit durch zwei Sextetts beschreiben, welche den  $\text{Fe}^{3+}$ - und den  $\text{Fe}^{2,5+}$ -Plätzen zugeordnet werden. Typische Parameter eines großen Kristalls bei Raumtemperatur sind:  $\delta_A = 0,26 \text{ mm/s}$ ,  $\delta_B = 0,67 \text{ mm/s}$ ,  $\Delta E_A = 0,02 \text{ mm/s}$ ,  $\Delta E_B = 0 \text{ mm/s}$ ,  $B_A = 49 \text{ T}$  und  $B_B = 46 \text{ T}$ . Unterhalb der Verwey-Temperatur sind die Mössbauerspektren aufgrund der zufälligen Ausfrierung nicht eindeutig interpretierbar [68].

### 3.1.3 Typisches Mössbauerspektrum von Magnetospirillum gryphiswaldense (MSR-1)

Als typisches Mössbauerspektrum des Bakteriums *M. gryphiswaldense* (Abb. 3.3) wird hier die Langzeitprobe DF23 (1230 Minuten nach  $^{57}\text{Fe}$  Zugabe) gezeigt. Das Spektrum bei  $T=130 \text{ K}$  enthält vier Subspektren, von denen zwei magnetisch aufgespaltene Sextetts und die beiden anderen Lorentzdubletts zeigen. Die beiden magnetischen Sextetts zeigen dabei Parameter von  $\delta_A = 0,39 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_{q,A} = 0,0 \text{ mms}^{-1}$  und  $\delta_B = 0,76 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_{q,B} = 0,0 \text{ mms}^{-1}$ , sowie Hyperfeinfelder  $B_A \approx 49,7 \text{ T}$  und  $B_B \approx 47,2 \text{ T}$ . Unterhalb von  $T=115 \text{ K}$  geht die deutliche Doppelppeakstruktur (im

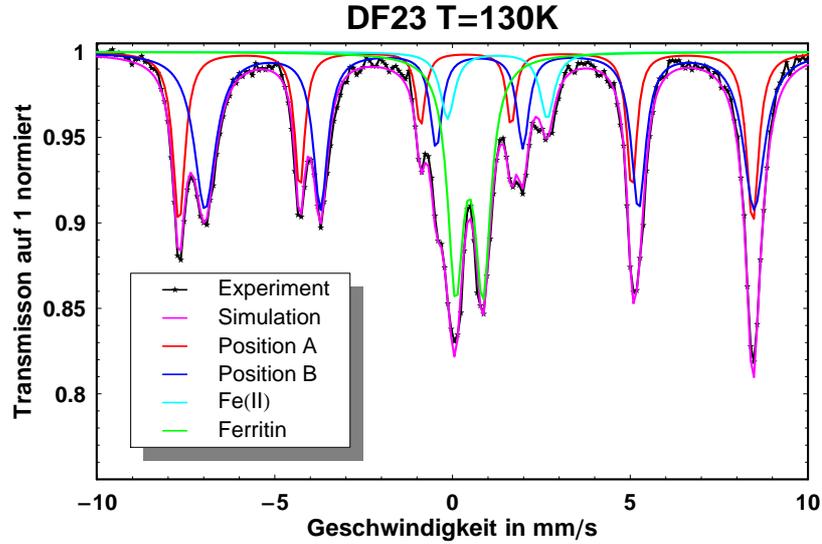


Abbildung 3.3: Typisches Mössbauerspektrum der Probe DF23 bei  $T=130\text{ K}$ . Die experimentellen Daten sind durch eine schwarze Führungslinie verbunden.

negativen Geschwindigkeitsbereich), bedingt durch den Verwey-Übergang, in eine breite Verteilung über. Dieses Verhalten ist typisch für Magnetit [70, 15, 68].

Das sehr dominante Dublett im Zentrum des Spektrums zeigt folgende Parameter:  $\delta = 0,48\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,76\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,52\text{ mms}^{-1}$ . Diese Komponente wird Ferritin zugeordnet und eingehender im Kapitel 3.5.2 besprochen.

Die vierte Komponente zeigt mit einer Isomeriewerschiebung von  $\delta = 1,25\text{ mms}^{-1}$ , einer Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = 2,8\text{ mms}^{-1}$  und einer Linienbreite von  $\Gamma = 0,44\text{ mms}^{-1}$  Parameter, wie sie typisch für  $\text{Fe}^{2+}$  in oktaedrischer Sauerstoff- oder Stickstoff-Ligandierung sind [70].

## 3.2 Material

Die in dieser Arbeit untersuchten Stämme des Organismus *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 [71], sowie die der nichtmagnetischen Mutanten MSR-1B [63],  $\Delta\text{mamB}$  und  $\Delta\text{mamM}$  [72], stammen aus dem Max Planck Institut für Marine Biologie, Bremen. Die Aufzucht fand unter kontrollierten Sauerstoff- und Eisenkonzentrationen in einem Fermenter statt [61, 53].

MSR-1 markiert den Wildtyp, welcher durch Schüler *et al.* [71] beschrieben wurde. MSR-1B ist eine spontane, nichtmagnetische Mutante [63]. Dieser Mutante fehlt ein Großteil ihrer Genominsel, welche dem Biomineralisationsprozess zugeordnet ist. Bei

$\Delta\text{mamM}$  und  $\Delta\text{mamB}$  handelt es sich um Mutanten, bei denen selektiv einzelne Gene entfernt sind [72].

Der Organismus wurde im Eisenmangel angezogen und schließlich mit  $^{57}\text{Fe}$  versetzt, um den Eisenaufnahmeprozess mittels der Mössbauerspektroskopie verfolgen zu können. Zu den jeweiligen Probenentnahmen wurden jeweils 1 Liter Medium abgenommen, zentrifugiert, gewaschen, konzentriert, in einen Mössbauerprobenhalter transferiert und eingefroren. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Transport wurde mittels Kühlung durch Trockeneis oder flüssigen Stickstoff durchgeführt.

Bei den Proben DF36, DF37 und DF38 wurde nach Wachstum in eisenhaltigem Nährmedium, dieses durch Waschen der Bakterien entfernt und durch ein eisenarmes Medium ersetzt, um den Wachstumsprozess im Eisenmangel zu studieren.

Die in der Tabelle 3.1 genannten Zeiten geben die verstrichene Zeit seit der Zugabe bzw. der Entfernung von Eisen an. Die Aufzucht erfolgte in einem Fermenter, wie er bei Heyen *et al.* [53] beschrieben ist.

## 3.3 Magnetisch induzierte differentiale Lichtstreuung

### 3.3.1 Einleitung

Zur Bestimmung des zellulären Magnetismus dient eine einfache Anordnung, wie sie bei Schüler *et al.* [73] beschrieben ist. Dazu wird die Lichtdurchlässigkeit einer Probe in Abhängigkeit eines äußeren Magnetfeldes bestimmt. Durch Anlegen des äußeren Magnetfeldes können die bereits magnetischen Bakterien in der Lösung ausgerichtet werden (siehe Abbildung 3.4). Durch die unterschiedliche Anordnung der Bakterien ergeben sich verschiedene Absorptionswerte, welche dann den Koeffizienten  $C_{mag}$  der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung MIDL ergeben:

$$C_{mag} = \frac{E_{max}}{E_{min}}, \quad (3.2)$$

wobei  $E_{max}$  und  $E_{min}$  die maximale, beziehungsweise die minimal gemessene Lichtausbeute sind.

Die verwendeten Parameter wurden von Dr. D. Faivre, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen, zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2 Erweiterung der Bedeutung der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung

Die MIDL betrachtet den Übergang von nichtmagnetischen Bakterien zu magnetischen Bakterien, ausgedrückt durch ihre Fähigkeit, sich als magnetisches Bakterium im

Tabelle 3.1: Tabelle der untersuchten Proben

Name	Stamm	Beschreibung
DF01	MSR-1wt	aerobes Wachstum
DF02	MSR-1B	microaerobes Wachstum
DF03	MSR-1wt	microaerobes Wachstum
DF10	MSR-1wt	microaerob, 60 min
DF11	MSR-1wt	microaerob, 95 min
DF12	MSR-1wt	microaerob, 125 min
DF13	MSR-1wt	microaerob, 155 min
DF14	MSR-1wt	microaerob, 215 min
DF15	MSR-1B	microaerob, 60 min, $3\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF16	MSR-1B	microaerob, 90 min, $3\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF17	MSR-1B	microaerob, 150 min, $3\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF19	MSR-1wt	microaerob, 20 min, $60\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF20	MSR-1wt	microaerob, 40 min, $60\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF21	MSR-1wt	microaerob, 60 min, $60\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF22	MSR-1wt	microaerob, 150 min, $60\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF23	MSR-1wt	microaerob, 1230 min, $60\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF23mag	MSR-1wt	isolierte Magnetosomen aus DF23
DF23 Zellreste	MSR-1wt	Zellreste aus der Isolierung der Magnetosomen DF23
DF30	$\Delta\text{mamM}$	microaerob, 1 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF31	$\Delta\text{mamM}$	microaerob, 3 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF32	$\Delta\text{mamM}$	microaerob, 20 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF33	$\Delta\text{mamB}$	microaerob, 1 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF34	$\Delta\text{mamB}$	microaerob, 3 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF35	$\Delta\text{mamB}$	microaerob, 20 h, $5\mu\text{M } ^{57}\text{Fe}$
DF36	MSR-1wt	microaerob, direkt nach der Eisenentfernung
DF37	MSR-1wt	microaerob, 2 h nach der Eisenentfernung
DF38	MSR-1wt	microaerob, 18 h nach der Eisenentfernung
DF40	MSR-1wt	aerob, Medium $\text{Fe}^{3+}$
DF41	MSR-1wt	microaerob, Medium $\text{Fe}^{2+}$
DF42	MSR-1wt	microaerob, Medium $\text{Fe}^{3+}$
MMC-BD	MSR-1B	Butanolfällung
MMC1	MSR-1B	Überstand, >100 kDa
MMC2	MSR-1B	Überstand, >10 kDa
MMC3	MSR-1B	Durchlauf
MMS1	MSR-1B	Sedimentfraktion
MMS2	MSR-1B	Sedimentfraktion
MS1	MSR-1wt	Sediment der Auftrennung
MDC1	MSR-1wt	Überstand, >100 kDa
MDC2	MSR-1wt	Überstand, >10 kDa
MDC3	MSR-1wt	Durchlauf

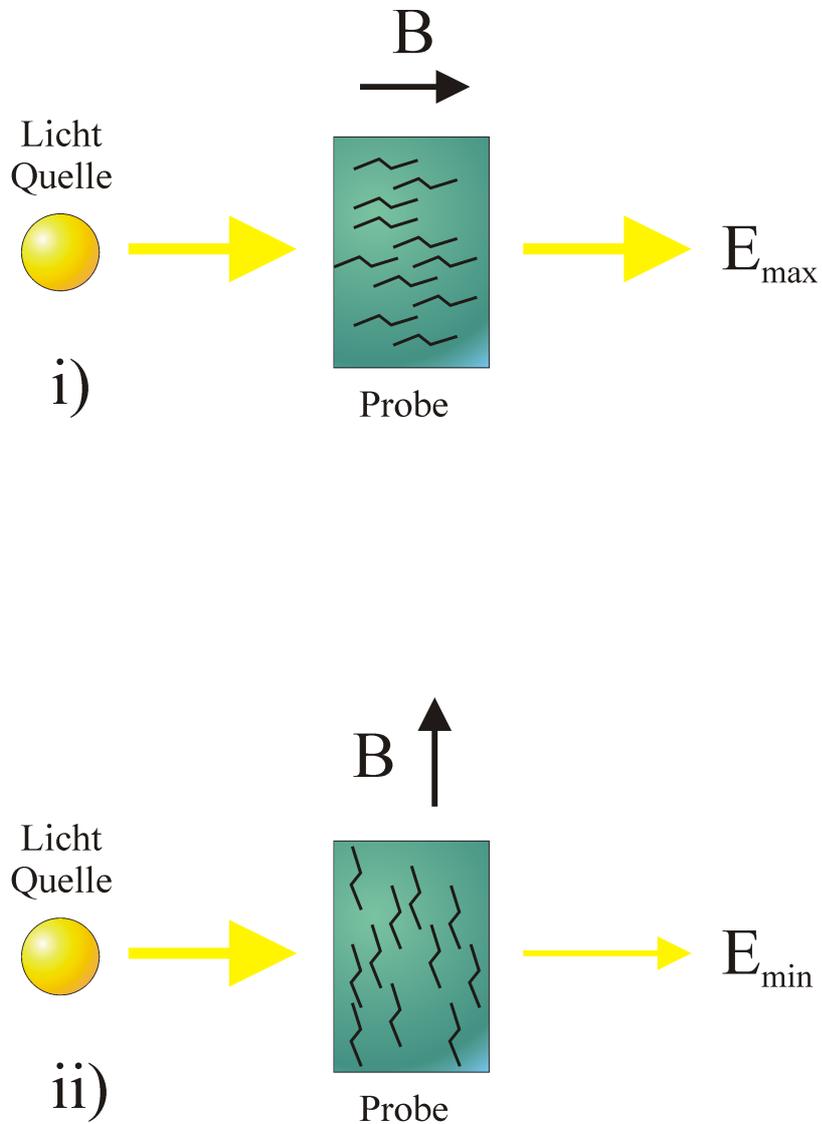


Abbildung 3.4: Funktionsprinzip der MIDL

Durch Drehung der Magnetfeldrichtung werden die magnetischen Bakterien gedreht und ergeben durch die unterschiedliche Lichtabsorption unterschiedliche Parameter für die Lichtstreuung.

äußeren Feld zu orientieren. Auf zwei Zustände reduziert lässt sich damit jedes Bakterium entweder als magnetisch oder nichtmagnetisch ansehen. Ein magnetisches Bakterium trägt dabei zur Entstehung der MIDL bei, ein nichtmagnetisches Bakterium nicht. Die in MIDL ermittelten Werte des Parameters  $C_{mag}$  entsprechen dabei dem Mittelwert des Probenensembles.

Als Modell lässt sich nun folgendes System vorstellen: Ein nichtmagnetisches Bakterium geht zum Zeitpunkt  $t_0$  in ein magnetisches Bakterium über und trägt ab diesem Zeitpunkt zur MIDL bei. Dieser Zeitpunkt  $t_0$  sei in einem Ensemble von Bakterien Gauß-verteilt um den Mittelwert  $\mu$  des Übergangpunktes:

$$f(t) = \frac{j}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - \mu}{\sigma} \right)^2 \right] \quad (3.3)$$

und habe dann die Breite  $\sigma$ . Die auftretende Konstante  $j$  wird zur Anpassung an die Messergebnisse benötigt. Sofern  $j = 1$  gilt, gibt die Funktion die Wahrscheinlichkeit für einen Übergang von einem nichtmagnetischen zu einem magnetischem Bakterium an. Der jeweils zur MIDL beitragende Anteil der Bakterien ist dann gegeben durch die Integration der Gleichung 3.3:

$$g(t) = \int_{-\infty}^t \frac{j}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t' - \mu}{\sigma} \right)^2 \right] dt'. \quad (3.4)$$

Ein Fit dieser Funktion auf die Daten der MIDL Messung einer Wachstumsreihe ergibt die Parameter  $\sigma = 37,9$  min,  $\mu = 148$  min und für die Konstante  $j = 1,67$  min (Abb.: 3.5). Der Fit lässt sich dabei nur auf die ersten sechs Messpunkte anwenden und kann den weiteren Anstieg der MIDL nicht erklären.

Eine Erweiterung dieses Modells stellt eine Einbeziehung der Abhängigkeit der MIDL von der Anzahl und Größe der in dem Bakterium vorhandenen Magnetosomen dar. Durch eine größere Anzahl bzw. Größe wird der Effekt der MIDL verstärkt, trägt aber nicht weiter zur Unterscheidung zwischen magnetischen und nichtmagnetischen Bakterien bei. Als einfachste Näherung wird die lineare Abhängigkeit dieser Zunahme angenommen. Damit werden die Gleichungen 3.3 und 3.4 um einen linearen Term erweitert zu:

$$f(t) = \frac{const}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t - \mu}{\sigma} \right)^2 \right] + t * h \quad (3.5)$$

und

$$g(t) = \int_{-\infty}^t \frac{const}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t' - \mu}{\sigma} \right)^2 \right] + t' * h dt'. \quad (3.6)$$

Dabei sei  $h$  die Rate des linearen Anstiegs in der Einheit  $\text{min}^{-1}$ .

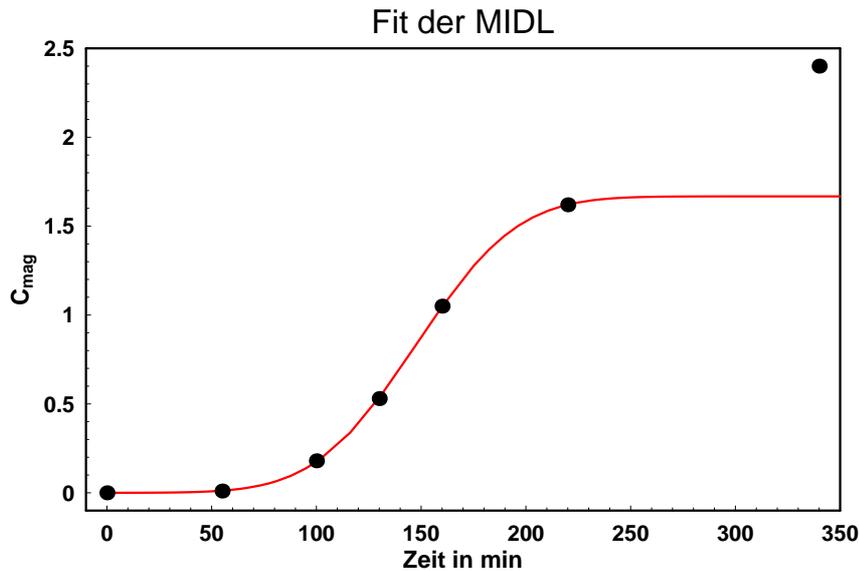


Abbildung 3.5: Fit der MIDL Messung I

Werden die Daten mittels dieses erweiterten Modells gefittet, so ergeben sich die Parameter zu:  $\sigma = 26,98 \text{ min}$ ,  $\mu = 143,3 \text{ min}$  und  $h = 0,0000118 \text{ min}^{-1}$ . Die Konstante *const* ist dabei auf  $1 \text{ min}^{-1}$  gesetzt. In Abbildung 3.6 sind die Daten und der Fit dargestellt. Dieses Modell ist in der Lage den beobachteten Anstieg zu erklären.

### 3.3.3 Diskussion

Das hier vorgestellte Modell erlaubt eine einfache Beschreibung der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung über die Wachstumszeit. Es ist gekennzeichnet durch den Übergang eines Ensembles nichtmagnetischer Bakterien in ein Ensemble magnetischer Bakterien. Die Erweiterung um einen linearen Term trägt dem unterschiedlichen Streuvermögen Rechnung, welche durch die unterschiedliche Anzahl und Größe der Magnetosomen zu unterschiedlichen Zeiten gegeben ist.

Der Parameter  $h$  beschreibt dabei die Zunahme der Lichtstrefähigkeit und damit auch indirekt die Aufnahme von Eisen.  $\mu$  ist in diesem Modell der Punkt, an dem 50% der Bakterien magnetisches Verhalten zeigen. Die Breite  $\sigma$  der Verteilung gibt die Homogenität des Modells wieder.

## 3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Magnetosomen mit einigen Nanometern Durchmesser werden in einer Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sichtbar (siehe Abb.: 3.1). Die Untersuchungen

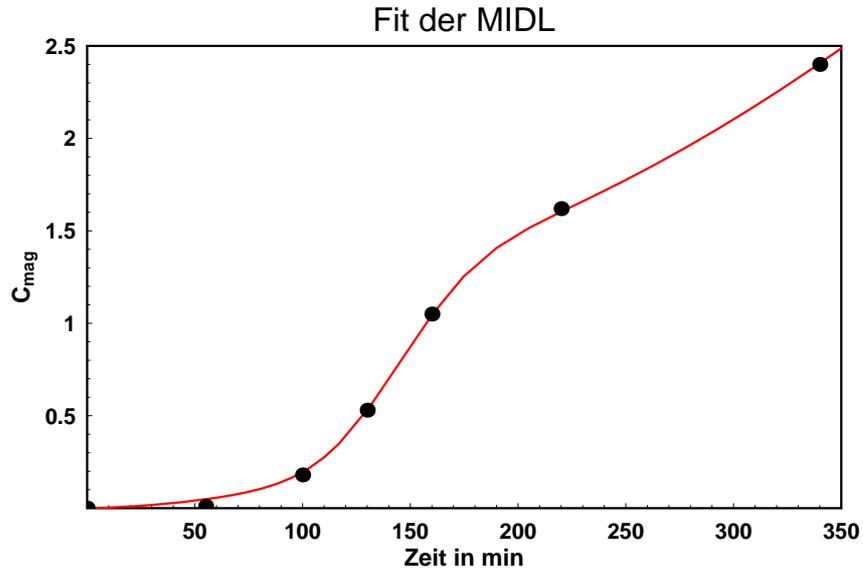


Abbildung 3.6: Fit der MIDL Messung II mittels des erweiterten Modells.

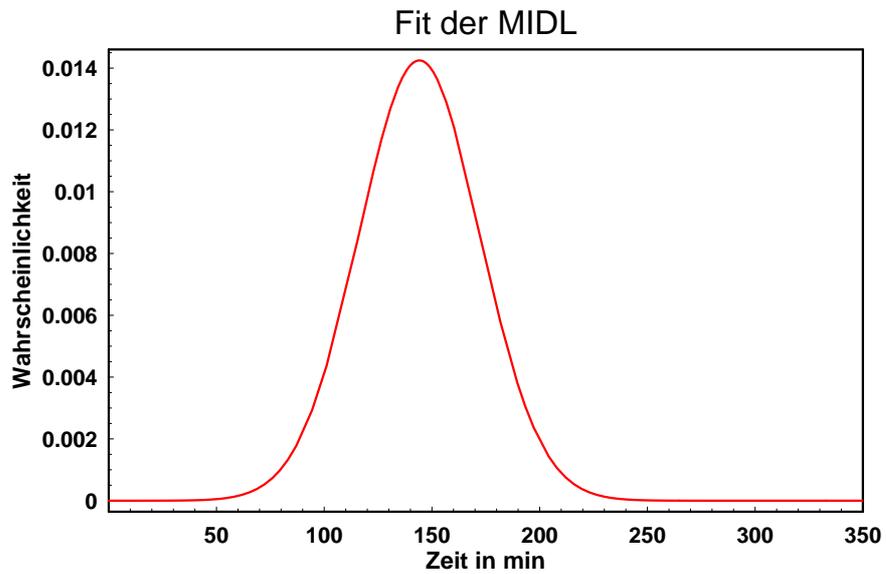


Abbildung 3.7: Gaußverteilung aus dem Fit II. Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit für ein Teilchen zur Zeit  $t$  in ein magnetisches Teilchen überzugehen. Der lineare Anteil, der zur Erklärung des weiteren Anstiegs des Parameters  $C_{mag}$  benötigt wird, ist nicht mit dargestellt.

per TEM wurden von Dr. Damien Faivre, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen (Gruppe von Prof. Dr. Dirk Schüler, Institut für Biology, LMU München), durchgeführt und zur weiteren Analyse zur Verfügung gestellt. Die TEM-holographischen Aufnahmen wurden in der Gruppe von R. F. Dunin-Borkowski, Dept. of Material Science, University of Camebridge, UK, erstellt.

Die Bilder geben dann Aufschluss über die durchschnittliche Entfernung  $r$  zwischen den Magnetosomen in einem einzelnen Bakterium, sowie deren durchschnittlichen Durchmesser  $d$  (siehe Tabelle 3.2) nach der Induktion mit  $^{57}\text{Fe}$ .

Tabelle 3.2: Durchschnittliche Entfernung und Durchmesser der Magnetosomen zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion mit  $^{57}\text{Fe}$ . Ermittelt aus den TEM-Aufnahmen.

Zeit in min	55	100	130	160	220	340
Entfernung $r$ in nm	127	75	56	41	29	19
Durchmesser $d$ in nm	19	19,4	20,3	22,7	26,3	33,1

### 3.4.1 Entfernung

Die Entfernung  $r$  nimmt dabei stetig mit der Zeit seit der Inkubation mit Eisen ab. Ein Fit der Form:

$$a * t^b + c \tag{3.7}$$

ergibt  $a = 7,20 * 10^{-6} \text{ nm/min}$  und  $c = -1.68 * 10^{-9} \text{ nm}$ , wenn  $b = -1$  gesetzt wird (Abb.: 3.8a). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass der Fit die Messwerte im ersten Abschnitt unterschätzt und später überschätzt. Dies legt eine Änderung des Wachstumsverhaltens nahe und erlaubt eine Unterteilung. Die vier ersten Messpunkte lassen sich mit dem Parametersatz:  $a_1 = 1,09 * 10^{-6} \text{ nm/min}$ ,  $b_1 = -0,33$  und  $c_1 = -1,61 * 10^{-7} \text{ nm}$  anpassen (blaue Kurve in Abb.: 3.8b) und die drei letzten Messwerte mittels  $a_2 = 2.97 * 10^{-5} \text{ nm/min}$ ,  $b_2 = -1,33$  und  $c_2 = 6,25 * 10^{-9}$  (grüne Kurve in Abb.: 3.8b). Dabei ist zu bemerken, dass im Fall des Fits mit einer Kurve nur zwei freie Parameter zur Anpassung benötigt werden (neben der Annahme  $b = -1$ ) und im Fall zweier Kurven bereits sechs Parameter benutzt wurden. Allerdings sagt der zweiteilige Fit für spätere Zeiten einen Abstand von  $c_2 = 6,25 \text{ nm}$  zwischen den Magnetosomen voraus. Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass zwischen den Magnetosomen zwei Vesikelmembranen (von je 2-3 nm Dicke) vorhanden sind [38, 47, 50].

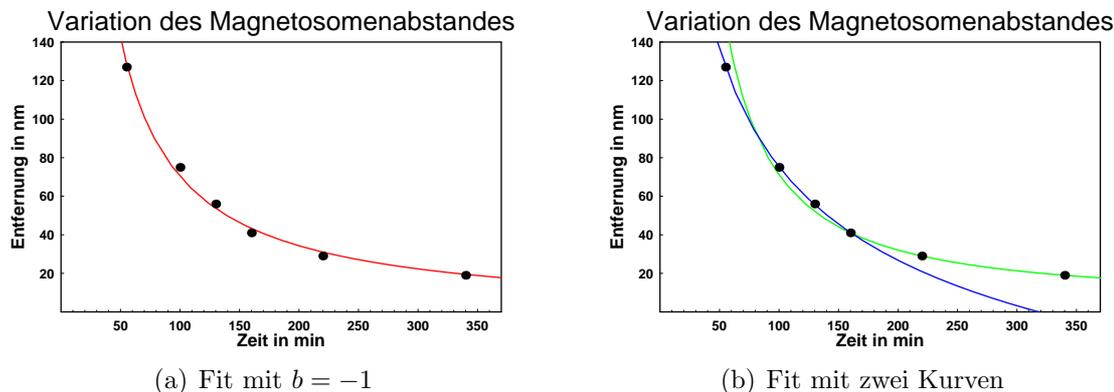


Abbildung 3.8: Fit der Magnetosom-Entfernung

Die schwarzen Punkte sind die Entfernungen aus der Transmissionselektronenmikroskopie. Die rote Kurve stellt einen Fit mit dem Koeffizienten  $b = -1$  dar. Die blaue Kurve wurde auf die ersten vier Messpunkte angepasst, die grüne Kurve auf die letzten drei Messpunkte.

### 3.4.2 Dynamik des Wachstumsprozesses

Abbildung 3.9a-e zeigt eine Serie von TEM Bildern bei verschiedenen Zeiten nach der  $^{57}\text{Fe}$  Induktion. Im Bild 3.9a ist die Situation zum Zeitpunkt der Induktion dargestellt. Es sind dabei keine Magnetosomen zu entdecken. Nach 55 min (Abb.: 3.9b) sind wenige einzelne Magnetosomen zu beobachten. Nach 100 min (Abb.: 3.9c) beobachtet man eine größere Anzahl von Magnetosomen, welche weiterhin einzeln auftreten. In Abbildung 3.9e treten erste Kontakte zwischen Magnetosomen auf. Nach 220 min (3.9f) können (mehrere) kurze Kettenfragmente im Bakterium erkannt werden. Die Anzahl der vorhandenen Magnetosomen hat weiter zugenommen. Erst in der Aufnahme nach 340 min (Abb.: 3.9g) sind die einzelnen Kettenfragmente zu einer längeren Kette zusammen gewachsen. Der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Kettenfragmenten liegt demnach um 160 min nach der  $^{57}\text{Fe}$  Induktion.

Die Aufnahmen zeigen auch, dass die Entfernungen zwischen den Magnetosomen heterogen innerhalb eines Bakteriums sind und die Abschätzung für die Entfernung nur für den Mittelwert eines größeren Ensembles gültig ist und nicht den Abstand jedes einzelnen Magnetosoms beschreiben kann.

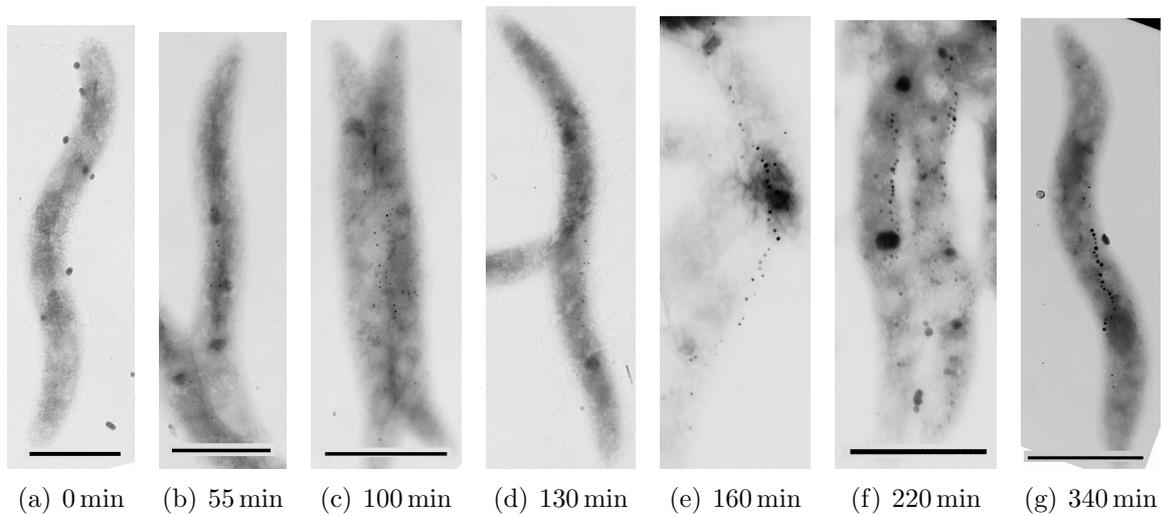


Abbildung 3.9: Elektronenmikroskopaufnahmen der Bakterien in verschiedenen Wachstumsstadien

Die Magnetosomen sind als scharf abgebildete dunkle Partikel zu erkennen. Die diffusen dunklen Bereiche, sind elektrodichtere Bereiche. Der untere schwarze Balken entspricht  $1 \mu\text{m}$ . Die Zeiten entsprechen der Zeit nach der  $^{57}\text{Fe}$  Zugabe. In (a) sind keine Magnetosomen zu erkennen, in (b), (c) und (d) sind vereinzelte Magnetosomen erkennbar, die in (e) vereinzelte Kontakte, in (f) kurze Ketten und schließlich in (g) lange Ketten bilden.

### 3.4.3 TEM Holographie

Zusätzlich zu den reinen TEM-Aufnahmen<sup>3</sup> kann die Phase der Elektronenwellen aufgezeichnet und über eine Fouriertransformation als Information zurück ins Bild transformiert werden. Durch diese Technik können in den Aufnahmen die Magnetfelder der Probe sichtbar gemacht werden [50].

Die Abbildung 3.10a zeigt eine TEM-Aufnahme mit einem  $C_{mag}$ -Wert von 0.1. Es sind nur einzelne Magnetosomen zu erkennen. Die Abbildung 3.10b zeigt denselben Bildausschnitt mit der TEM-Holographie. Die Magnetfeldlinien sind in den Magnetosomen konzentriert, aber räumlich nicht orientiert. Die Aufnahme 3.10c zeigt ein Beispiel für einen  $C_{mag}$ -Wert von 0.8. Die Magnetosomen haben sich bereits zu kurzen Kettenfragmenten zusammengeschlossen. Die dazugehörige Holographieaufnahme ist in Abbildungen 3.10d dargestellt und macht deutlich, dass sich die Magnetfeldlinien durch die Zusammenlagerung der Magnetosomen innerhalb des Kettenfragmentes

<sup>3</sup>Die TEM-holographischen Aufnahmen wurden in der Arbeitsgruppe von R. F. Dunin-Borkowski, Dept. of Material Science, University of Cambridge, UK, aufgenommen.

orientieren. Die Abbildung 3.11 zeigt eine Probe mit einem  $C_{mag}$ -Wert von 2.8 (ausgewachsenes Stadium). Die Magnetfeldlinien laufen entlang der Magnetosomen. In Bereichen mit Abständen in der Größenordnung von einem Teilchendurchmesser, verbreitern sich die Feldlinien in dem Zwischenraum (schwarzer Pfeil in Abb.: 3.11), ohne jedoch zwei einzelne Kettenfragmente zu bilden.

#### 3.4.4 Diskussion

Die durchschnittliche Entfernung der Magnetosomen lässt sich durch ein antiproportionales Verhalten beschreiben, wie es durch die Gleichung 3.7 gegeben ist. Diese Gleichung beschreibt allerdings nur das durchschnittliche Verhalten. Aus den Bildern 3.9 und 3.10 ist ersichtlich, dass die Magnetosomen heterogene Abstände untereinander haben und erst dann einheitliche Abstände bilden, wenn sich Ketten von Magnetosomen gebildet haben.

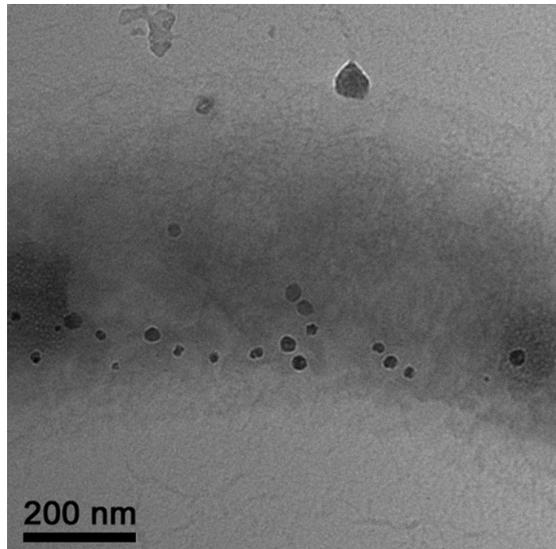
Aus der Aufnahme 3.10b ist ersichtlich, dass isolierte Magnetosomen eine zufällige Verteilung ihrer Magnetfeldachse haben. Erst die Annäherung an die Nachbarmagnetosomen richtet die Magnetfeldachsen entlang der Kettenfragmente aus (3.10d). Aus der Literatur [74, 50] ist bekannt, dass in *Aquaspirillum magnetacticum* die Magnetosomen mit ihrer kristallographischen [111]-Achse entlang der Kettenachse und damit entlang der Verbindungsachse zwischen den Teilchen ausgerichtet sind. Letztendlich müssen sich daher die Magnetosomen während ihres Annäherungsprozesses ausrichten. Für Ferrofluide ist eine solche Selbstordnung durchaus bekannt [75].

## 3.5 Mössbauerspektroskopie

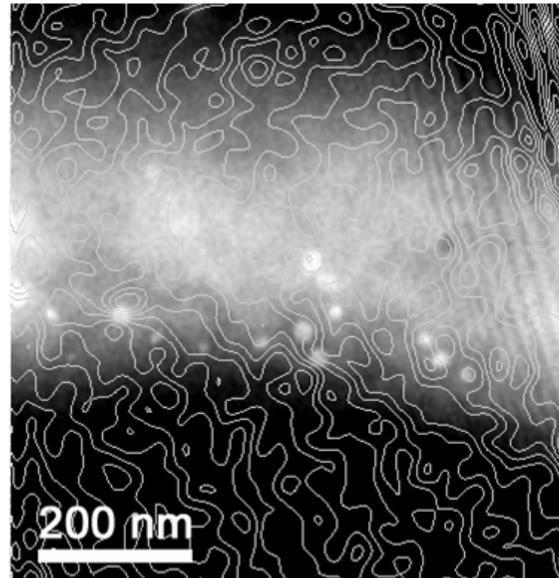
### 3.5.1 Das Wachstumsverhalten von *M. gryphiswaldense*

Die Beobachtung des Wachstumsverhaltens von Bakterium *M. gryphiswaldense* gibt die Möglichkeit, den zeitlichen Ablauf der Magnetosomsynthese nachzuvollziehen. Die Verwendung von  $^{57}\text{Fe}$  als mössbauerspektroskopisch aktives Isotop zur Induktion erlaubt gezielt die Betrachtung des Eisentransportes im Bakterium auf Zeitskalen im Minutenbereich. Zur Beantwortung stehen hier die Fragen, ob es dedizierte Vorstufen zu den Magnetosomen gibt und welche diese sind. Ebenso soll geklärt werden, in welcher Form und welchem zeitlichen Ablauf das Eisen im Bakterium aufgenommen, gespeichert und transportiert wird.

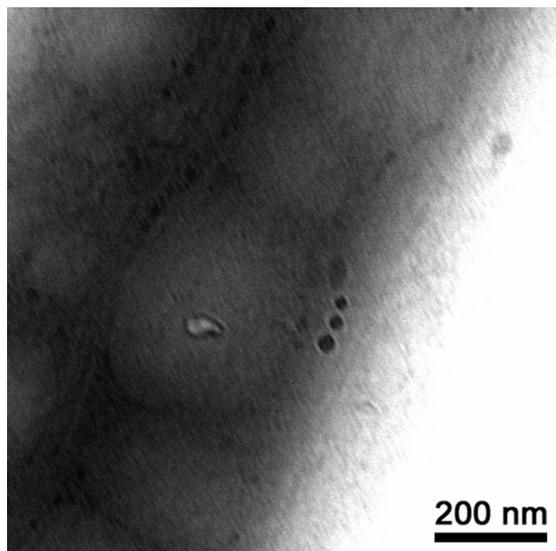
Zur Untersuchung des Wachstums und der Magnetitbildung wurde das Bakterium *M. gryphiswaldense* im Eisenmangel angezogen. Es befindet sich im stationären Zustand, in dem die Zellen keine Teilung und nur sehr geringe Stoffwechselaktivität aufweisen [61, 48]. Zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  min wurde das Wachstumsmedium gewechselt. Das neue Medium enthielt nur sehr geringe Mengen an Nährstoffen, die kein



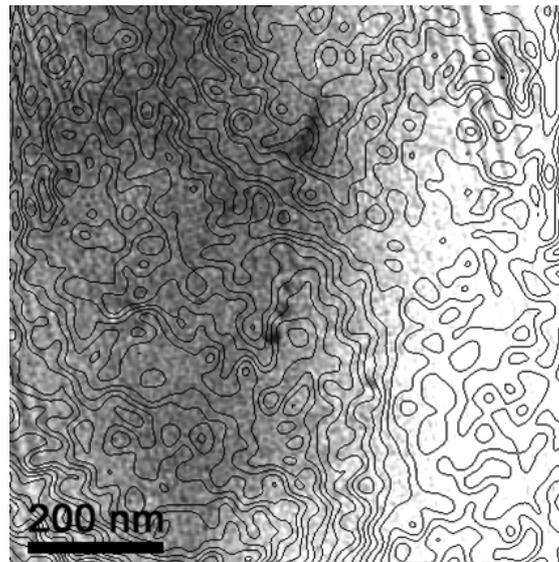
(a) EM-Bild



(b) Holographie von a)



(c) EM-Bild



(d) Holographie von c)

Abbildung 3.10: TEM und Holographie

Die linke Spalte zeigt die TEM-Bilder, die rechte die dazu korrespondierenden Holographien. Für die obere Reihe ist der Parameter  $C_{mag} = 0.1$ , für die untere  $C_{mag} = 0.8$ .

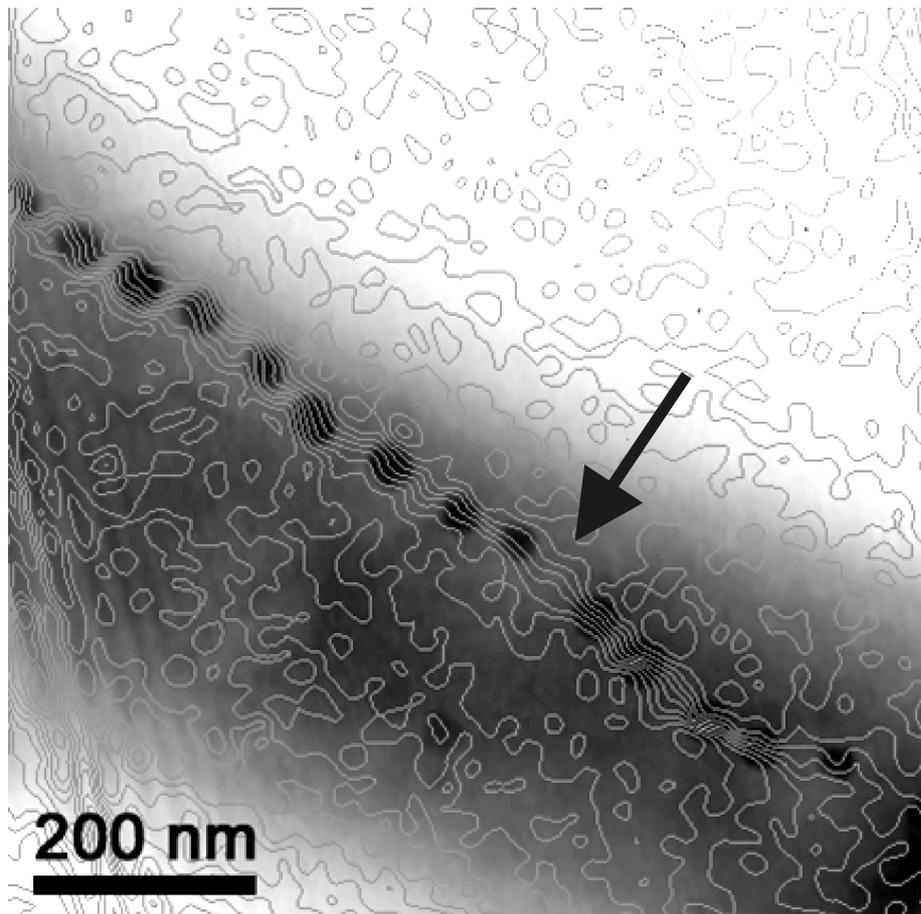


Abbildung 3.11: TEM-Holographie einer Magnetosomenkette

Die Holographie einer vollständigen Magnetosomenkette zeigt, dass die Magnetfeldlinien innerhalb der Kette verlaufen und auch bei Abständen, welche in der Größenordnung der Magnetosomen liegen (schwarzer Pfeil), noch durchgängig vorhanden sind. Die Aufnahme stammt von einer Probe mit einem  $C_{mag}$ -Wert von 2.8.

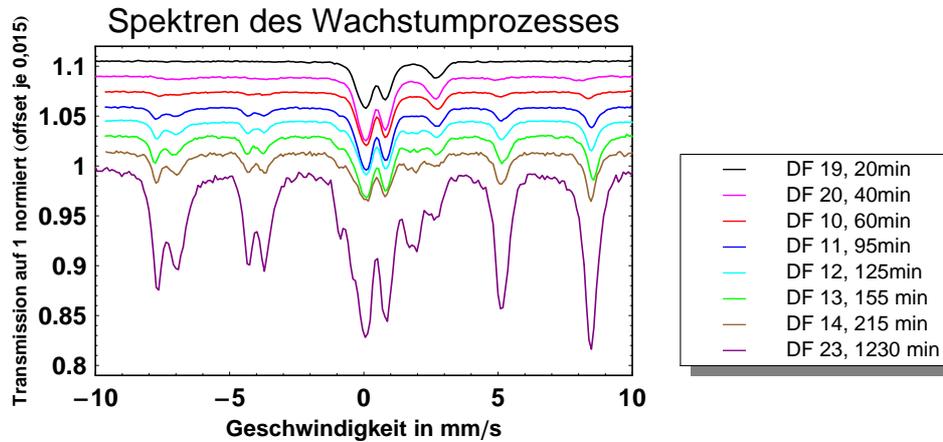


Abbildung 3.12: Mössbauerspektren von den Proben DF19, DF20, DF10, DF12, DF13, DF14 und DF23

Die Spektren wurden je mit einem additiven Offset von 0.015 dargestellt. Die Serie zeigt von oben nach unten die Spektren zu verschiedenen Zeiten (20, 40, 60, 95, 125, 155, 215, 1230 Minuten) des Wachstums des Stammes MSR-1 nach Zugabe von  $^{57}\text{Fe}$ . Die Spektren sind einzeln in den Abbildungen 3.14 und 3.15, die Parameter in den Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellt. Eine Ausschnittsvergrößerung ist als Abbildung 3.13 angefügt.

weiteres Wachstum ermöglichen (steady state), jedoch alle Vitalfunktionen aufrecht erhalten bleiben [53, 48]. Das Medium wurde zusätzlich mit  $^{57}\text{Fe}$  versorgt, so dass die Eisenmangelsituation beseitigt war [76]. Nur auf diese Weise können Nährstoffwechsel bezogene Vorgänge von Wachstumsvorgängen unterschieden werden.

Zum Zeitpunkt  $t_0 = 0$  min wurde dem Medium  $^{57}\text{Fe}$  zugefügt und später zu verschiedenen Zeiten ( $t = 20; 40; 60; 95; 125; 155; 215$  und  $1230$  min)<sup>4</sup> Probenmaterial entnommen und diese durch die Mössbauerspektroskopie untersucht.

Die Mössbauerspektren lassen sich mit Hilfe von zwei Sextetts für die A und B Plätze des Magnetits und je ein Dublett für die Ferritin und die  $\text{Fe}^{2+}$  Komponente anpassen. Das Verhältnis der Linienintensitäten beträgt 3:2:1:1:2:3 und ein Verhältnis der A und B Plätze ist auf 1 : 2 festgelegt. Die Linienbreiten waren paarweise frei. Für die Fits wurden für alle Zeiten die gleichen Isomerieverschiebungen und Quadrupolaufspaltungen verwendet.

<sup>4</sup>Die Proben für 20, 40 und 1230 Minuten stammen aus einer zweiten Probenserie, welche unter denselben Bedingungen wie die in der ersten Serie hergestellt wurden.

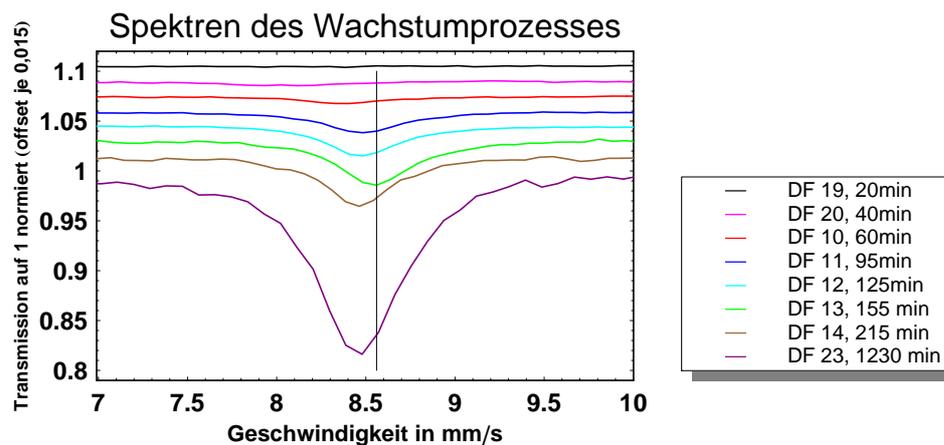


Abbildung 3.13: Mössbauerspektren von den Proben DF19, DF20, DF10, DF12, DF13, DF14 und DF23

Die Spektren wurden je mit einem additiven Offset von 0.015 dargestellt. Die Serie zeigt von oben nach unten die Spektren zu verschiedenen Zeiten (20, 40, 60, 95, 125, 155, 215, 1230 Minuten) des Wachstums des Stammes MSR-1 nach Zugabe von  $^{57}\text{Fe}$ . Die Spektren sind einzeln in den Abbildungen 3.14 und 3.15, die Parameter in den Tabellen 3.3 und 3.4 dargestellt. Die Spektren wurden nur im Bereich von +7 bis +10 mm/s dargestellt. Die senkrechte schwarze Linie gibt das Maximum der Aufspaltung bei 155 min wieder.

Tabelle 3.3: Hyperfeinfelder und Flächenanteile der Simulationen der Wachstumsreihe. Die Zeit gibt die verstrichene Zeit seit der Zugabe von  $^{57}\text{Fe}$  an.

Zeit in min	20	40	60	95	125	155	215	1230
Probe #	DF19	DF20	DF10	DF11	DF12	DF13	DF14	DF23
Hyperfeinfelder								
$B_{hf,A}$ in T	46	48	49,1	49,7	49,8	50,1	49,6	50,1
$B_{hf,A}$ in T	43,7	45,5	47	47,6	47,6	48	47,4	47,8
Flächenanteile								
A in %	0,6	5	7,8	13,7	17,7	19,6	22	23,9
B in %	1,2	10	15,6	27,4	35,4	39,2	44	47,8
Ferritin in %	63,5	57,5	53	41,5	34,2	29,9	25,5	21,9
$\text{Fe}^{2+}$ in %	34,7	27,5	23,6	17,4	12,7	11,3	8,5	6,4

Tabelle 3.4: Parameter der Simulationen der Wachstumsreihe. Die Linienbreiten der Magnetit A- und B-Plätze wurden in jedem Spektrum paarweise angepasst (1 & 6, 2 & 5, 3 & 4).

Name	$\delta$ in $\text{mms}^{-1}$	$\Delta E_Q$ in $\text{mms}^{-1}$	$\Gamma$ in $\text{mms}^{-1}$
Magnetit A	0,38	0	-
Magnetit B	0,76	0	-
Ferritin	0,48	0,73	0,51
$\text{Fe}^{2+}$	1,28	2,85	0,49

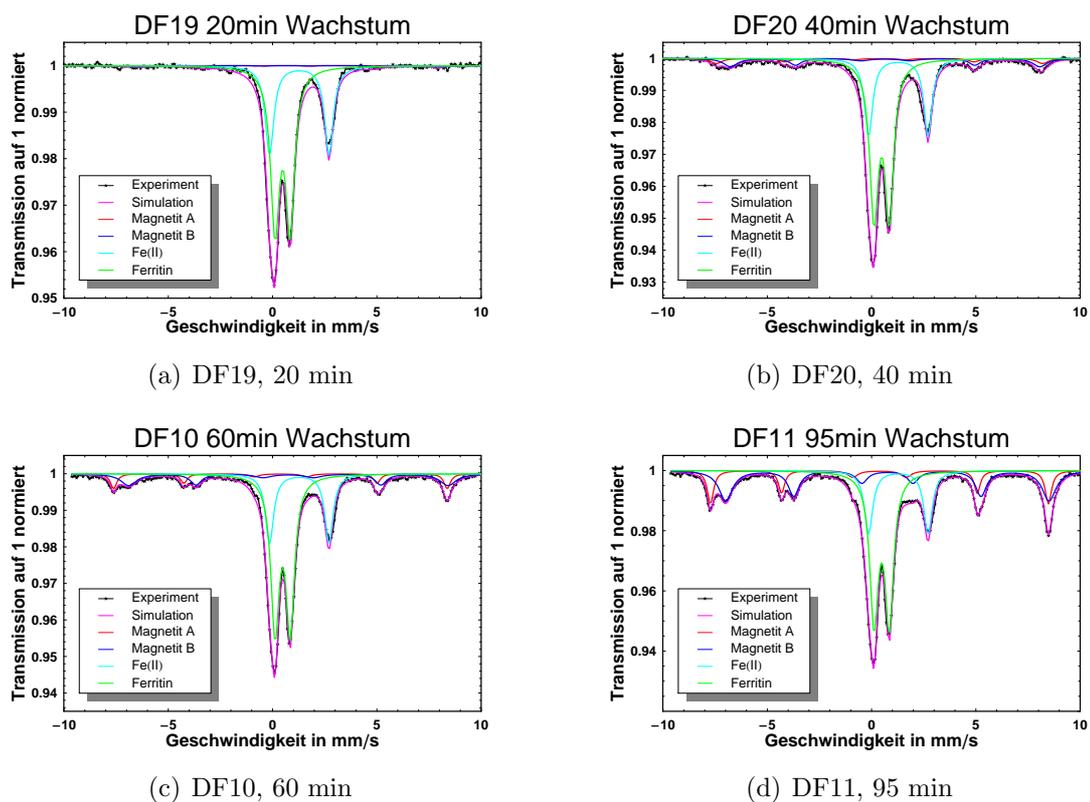


Abbildung 3.14: Einzelspektren der Wachstumsreihe  
 Die Parameter der Fits sind in Tabelle 3.3 und 3.4 aufgelistet.

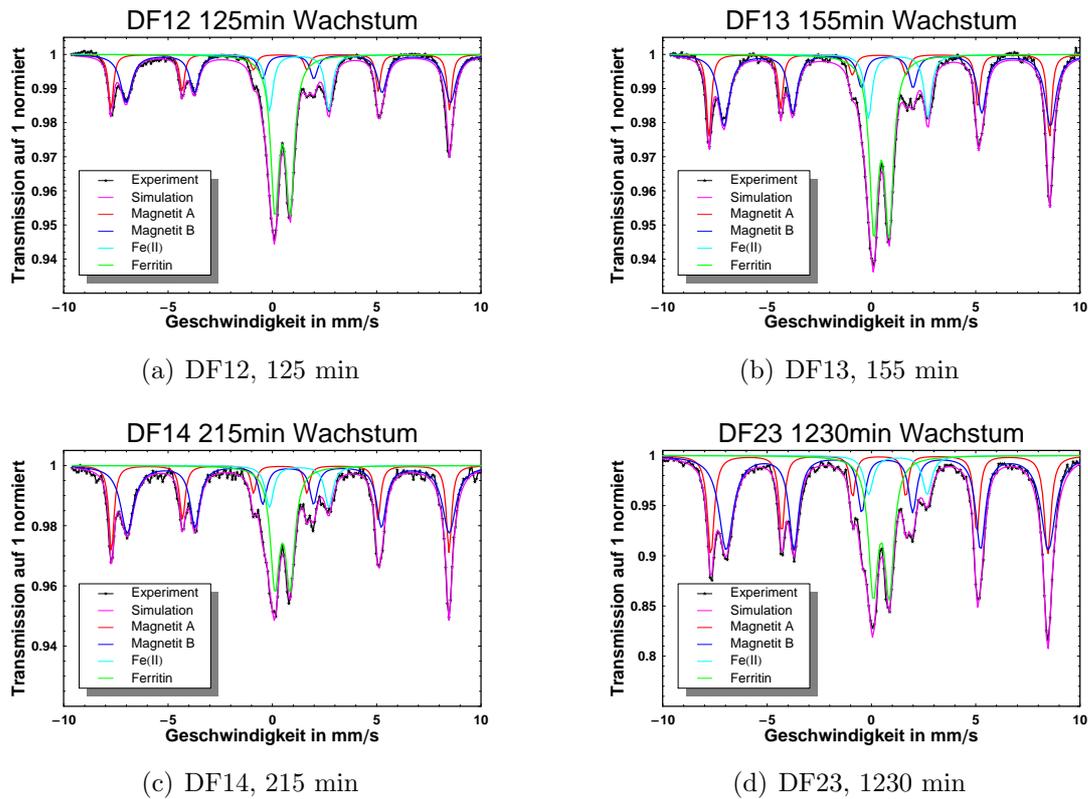


Abbildung 3.15: Einzelspektren der Wachstumsserie

Die Parameter der Fits sind in Tabelle 3.3 und 3.4 aufgelistet.

In den Abbildungen 3.12, 3.13, 3.14 und 3.15 sind die Spektren dieses Wachstumsprozesses dargestellt. Eine vergrößerte Darstellung der Probe DF19 ist als Abbildung B.1 angefügt.

In allen Mössbauerspektren dieser Wachstumsserie können nur die drei Komponenten Magnetit (mit den A- und B-Plätzen), Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$  identifiziert werden. Die aus den Mössbauerspektren ermittelten Parameter der Subspektren sind in den Tabellen 3.3 und 3.4 zusammengefasst.

Im Verlauf des Wachstums steigt der absolute Anteil des Magnetits annähernd linear an (siehe Abbildung 3.16b) und schwächt sich dann im letzten Messpunkt ab. Die absoluten Anteile des Ferritins und  $\text{Fe}^{2+}$  bleiben auf niedrigem Niveau ( $< 10\%$ ), zeigen aber keine erkennbare Tendenz. In der relativen Darstellung (Abb. 3.16a) ist der starke Anstieg ( $\geq 65\%$  in 200 min) des Magnetosomanteils gegenüber dem Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\leq 65\%$ ) im Bereich bis circa 200 min zu beobachten. Danach ändert sich das Verhältnis zwischen dem Magnetosomanteil und den beiden anderen Komponenten (Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$ ) nur noch gering und pendelt sich auf 71,6% für das Magnetit, 22% für das Ferritin und 6,4% für das  $\text{Fe}^{2+}$  ein.

Die Hyperfeinfelder des Magnetits zeigen in diesem Wachstumsverlauf (3.17) zuerst einen Anstieg bis zu einem Maximum nach circa 155 min nach der Induktion und dann einen Rückgang um circa 0,6 T. Dieses Verhalten betrifft sowohl die Magnetit A, als auch die Magnetit B Komponente des Spektrums und lässt sich bereits durch den Vergleich der Mössbauerspektren erkennen (siehe Abbildung 3.12 und 3.13, z. B. bei  $\sim +9$  mm/s). Für das Hyperfeinfeld des magnetisch aufgespaltenen Spektrums ergibt sich beim Maximum nach 155 min ein Wert von  $B_{hf,A}=50,1$  T ( $B_{hf,B}=48$  T). In der Langzeitprobe nach 1230 min ergibt sich für das Hyperfeinfeld ein Wert von  $B_{hf,A}=50,1$  T ( $B_{hf,B}=47,8$  T).

Eine Abschätzung der Größe der Magnetosomen kann durch die Gleichung 2.82 gegeben werden und ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Als Hyperfeinfeld des ausgedehnten Kristalls wurde  $B_{hf}(\infty, T) = 50,2$  T und als Anisotropiekonstante  $K = 100000 \text{ Jm}^{-3}$  [15] gesetzt. Für die Magnetosomen der Probe nach 20 min lässt sich damit der Durchmesser auf circa 5,5 nm abschätzen, für die Probe nach 40 min auf circa 6,5 nm.

Dieses Verhalten der Reduktion des Hyperfeinfeldes lässt sich durch die Bildung von Ketten verstehen: Magnetitpartikel in der Größenordnung der Magnetosomen sind eindomänige Teilchen [16, 40, 50] und somit vollständig bis zu ihrer Sättigung magnetisiert. Bei Magnetit liegt diese Sättigungsmagnetisierung in der Größenordnung von 0,6 T [50]. Nähern sich nun zwei Teilchen, so wirkt das eine Teilchen mit seiner Sättigungsmagnetisierung (wie ein äußeres Magnetfeld) auf das andere Teilchen und vermindert dessen Hyperfeinfeld. Als Modell kann hier der graduelle Übergang von einem ungestörten Teilchen zu einem Teilchen im äußeren Magnetfeld dienen.

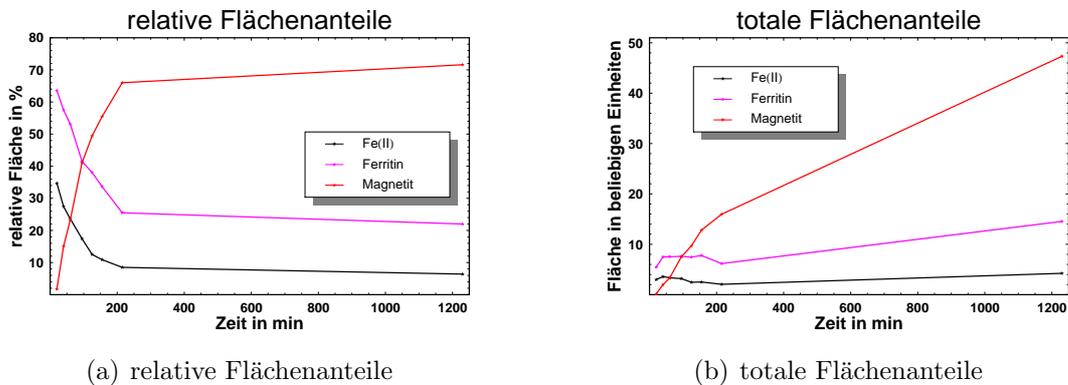


Abbildung 3.16: Wachstumskurven des Magnetitanteils

Die Sterne geben die Messpunkte wieder und wurden mit Führungslinien verbunden. Die totalen Flächenanteile sind mit der Probenmasse skaliert dargestellt.

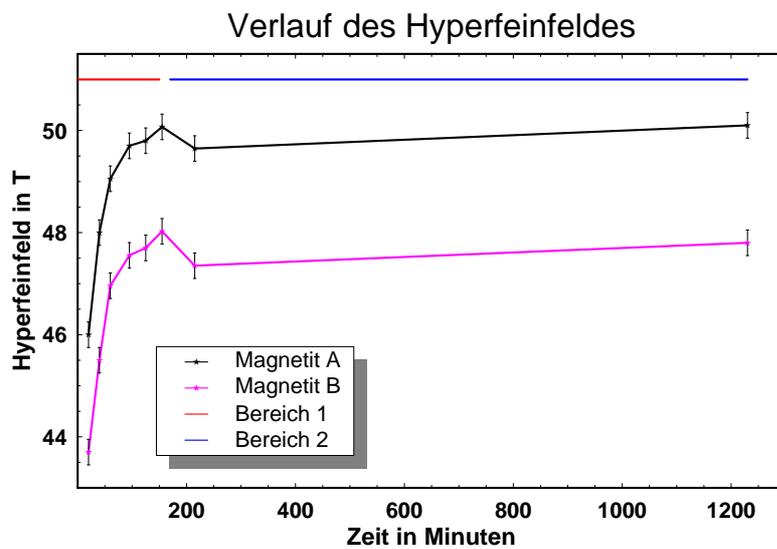


Abbildung 3.17: Verlauf des Hyperfeinfeldes in der Wachstumsserie

Die Kurve für den Magnetit A Platz ist in schwarz, für den B Platz in magenta dargestellt. Die rote Linie kennzeichnet den Bereich 1 mit Einzelkristallwachstum, die blaue Linie den Bereich 2 mit Kettenwachstum.

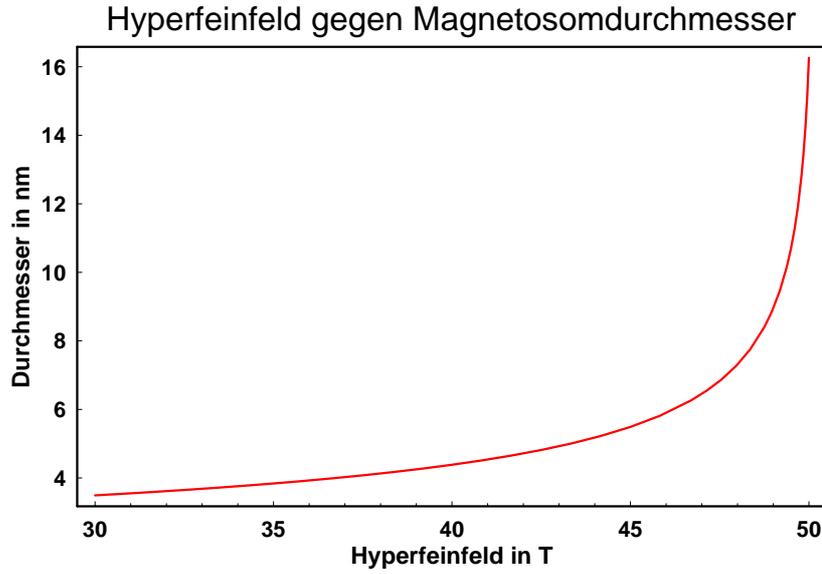


Abbildung 3.18: Verlauf des Hyperfeinfeldes bezüglich der Teilchendurchmesser

Die Kurve gibt den theoretischen Verlauf des Teilchendurchmessers in Abhängigkeit des beobachteten Hyperfeinfeldes des Magnetit A Platzes.

Dieser Übergang lässt sich durch eine aufsummierte Gauß-Kurve wiedergeben:

$$G(t') = \int_{-\infty}^{t'} \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{t' - \mu}{\sigma} \right)^2 \right] dt. \quad (3.8)$$

Zur Beschreibung der Magnetosomen dient das einfache Modell (Modell 1) des durch die Kristallanisotropie dominierten Verhaltens, welches qualitativ durch die Langevin-Funktion beschrieben wird:

$$\mathbb{L}(t) = \coth(t) - \frac{1}{t}. \quad (3.9)$$

Kombiniert ergibt sich dann als Modell folgende Gleichung:

$$B_{hf}(t) = (1-G(t)) * B_{hf}(\infty, T) * \mathbb{L} \left( \frac{KV}{k_B T} \right) + G(t) * \left( B_{hf}(\infty, T) * \mathbb{L} \left( \frac{KV}{k_B T} \right) - 0,6 \text{ T} \right). \quad (3.10)$$

Der Übergangspunkt ist durch den Parameter  $\mu$  gegeben. Als Breite der Verteilung wurde  $\sigma = 10$  min gewählt. Die Modellrechnung ist in Abbildung 3.19 wiedergegeben. Der Verlauf des Hyperfeinfeldes lässt sich mit diesem Modell erklären, wenn  $\mu = 175$  min gesetzt wird.

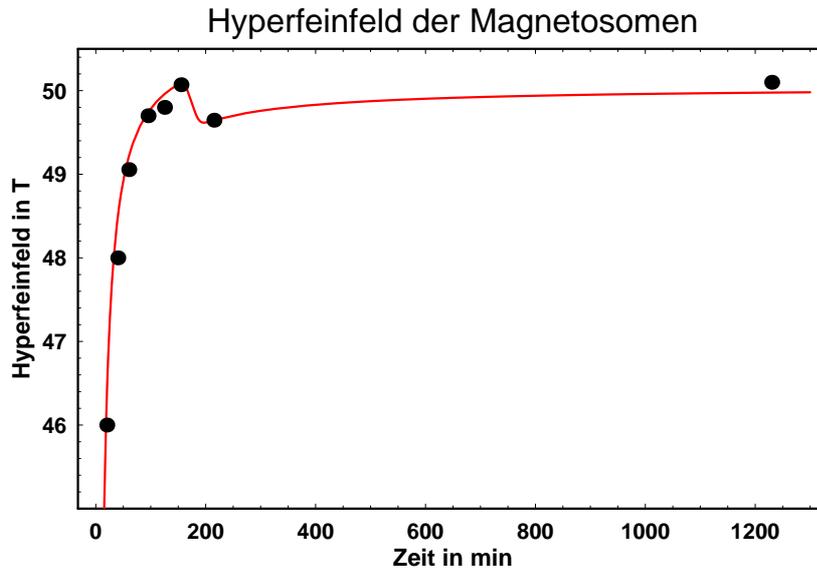


Abbildung 3.19: Verlauf des Hyperfeinfeldes in der Wachstumsserie (Model 1)  
 Die rote Kurve gibt die Simulation des Hyperfeinfeldverlaufs des Magnetit A-Platzes wieder. Die schwarzen Punkte sind die in den Mössbauerspektren ermittelten Hyperfeinfeldere

Auf ein einzelnes Magnetosom (A) in einer Kette wirken die übrigen Magnetosomen (B) über ihr Magnetfeld. Das Feld der Magnetosomen B wirkt dann mit einem (externen) Feld auf das Magnetosom A. Das Hyperfeinfeld des Magnetosoms A lässt sich dann durch die Gleichung 3.15 beschreiben (siehe unten).

Im Fall einer frühen Probe ( $t < 150$  min) kann ein Magnetosom (A) als isoliertes Teilchen betrachtet werden, welches die übrigen Magnetosomen (B) nicht spürt. Nähern sich die Magnetosomen einander, so befindet sich das Magnetosom A in einem äußeren Feld, welches durch die übrigen Magnetosomen B erzeugt wird. Dieses äußere Feld wird durch die magnetischen Momente  $\mu_i$  der Magnetosomen erzeugt. Als Modell für dieses äußere Feld können zwei Kreisspulen dienen, welche sich rechts und links von dem Magnetosom A befinden. Das magnetische Feld in  $z$ -Richtung einer solchen Anordnung lässt sich berechnen als [77]:

$$B_z = \frac{\mu_0 I \pi R^2}{2\pi(z^2 + R^2)^{\frac{3}{2}}}. \quad (3.11)$$

Dabei stellt  $R$  den Radius der Kreisspule dar und  $I$  den Strom, welcher durch diese Spule fließt. Der Radius wird in diesem Modell als der Radius eines Teilchens gewählt

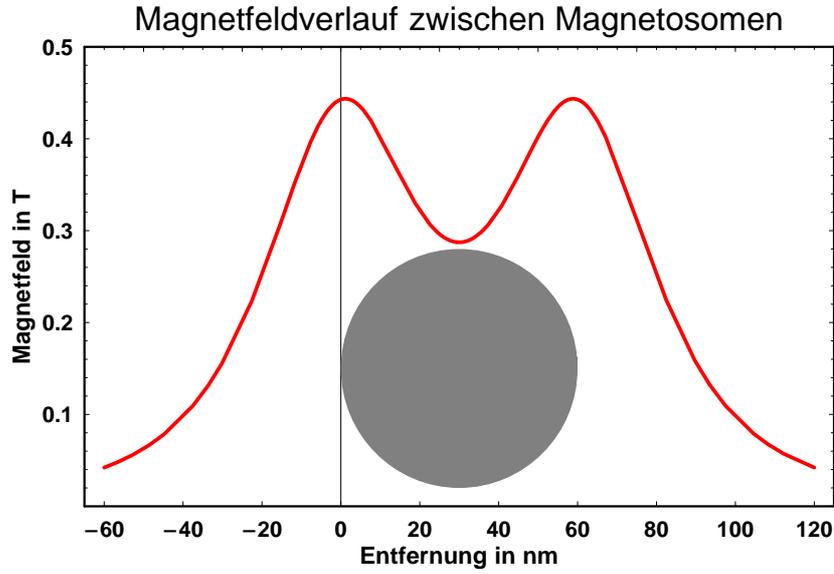


Abbildung 3.20: Verlauf des magnetischen Feldes zwischen zwei Magnetosomen

Die rote Kurve gibt die Simulation von zwei Kreisspulen im Abstand von  $r = 60$  nm wieder. Der graue Kreis symbolisiert ein Magnetosom zwischen den beiden Kreisspulen bei 0 nm und 60 nm.

( $R \sim 30$  nm). Der Strom wird aus der Beziehung

$$\mu = IA = I\pi R^2 = M_s V = M_s \frac{4}{3}\pi R^3, \quad (3.12)$$

ermittelt und ergibt sich dann zu

$$I = M_s \frac{4}{3}R, \quad (3.13)$$

bzw. eingesetzt in 3.11 ergibt sich für  $B_z$ :

$$B_z = \frac{\mu_0 M_s \frac{4}{3}R\pi R^2}{2\pi(z^2 + R^2)^{\frac{3}{2}}}. \quad (3.14)$$

Für zwei Teilchen (Spulen) mit einem Abstand von  $r = 60$  nm ist der Feldverlauf in Abbildung 3.20 dargestellt. Befindet sich nun zwischen den beiden Teilchen (Spulen) ein weiteres Magnetosom A, so befindet sich dieses in einem äußerem Magnetfeld  $B_{ext}$ , welches dem Hyperfeinfeld  $B_0$  der  $^{57}\text{Fe}$ -Kerne in A überlagert ist:

$$B_{hf} = B_{ext} + B_0. \quad (3.15)$$

Dabei ist  $B_{hf}$  das mittels Mössbauerspektroskopie ermittelbare Hyperfeinfeld und  $B_0$  das intrinsische Hyperfeinfeld der  $^{57}\text{Fe}$ -Kerne in A. Dieses Modell ergibt ein mittleres magnetisches Feld von circa 0.35 T innerhalb des Magnetosoms A. Das im Experiment ermittelte Hyperfeinfeld liegt circa um 0.6 T niedriger als es erwartet wird. Dieses einfache Modell kann die Reduktion nicht vollständig erklären, liefert aber einen Beitrag in der Größenordnung der Reduktion. Die TEM-Aufnahmen (Abb.: 3.11) einer fast vollständigen Magnetosomenkette liefert einen Beweis für die Reichweite der Magnetfelder innerhalb einer Magnetosomenkette und belegt dadurch die Richtigkeit der Annahme eines äußeren Feldes für jedes Magnetosom.

Eine weitere Erklärung leitet sich aus dem annähernd linearen Eiseneintrag in die Bakterien ab. Sofern nur ein Teilchen im Bakterium vorhanden ist, wächst dessen Volumen linear. Bilden sich nun weitere Teilchen im Bakterium, so wird sich das zur Verfügung stehende Eisen auf alle Teilchen aufteilen und der Volumenzuwachs pro Teilchen pro Zeit dadurch verringert. In dem Bakterium sind dann mehrere Teilchen vorhanden, welche alle ein unterschiedliches Volumen aufweisen und immer langsamer ihr Volumen vergrößern.

Eine Rechnung mit diesem Modell ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Die verwendete Funktion zur Teilchenanzahl ist in der Abbildung 3.22 aufgetragen. Die Fluktuationen des Hyperfeinfeldes entstehen durch die begrenzte Anzahl an verwendeten Teilchen und verschwinden beim Übergang zu einem Modell mit einer größeren Anzahl an Teilchen.

Den TEM-Bildern kann entnommen werden, dass eine Verteilung von verschieden großen Magnetosomen vorliegt und ebenso, dass deren Zahl über die Zeit kontinuierlich wächst (Abb.: 3.9). Somit ist zu vermuten, dass beide Modelle einen Teil zur Erklärung der Verminderung des Hyperfeinfeldes beitragen. Ihr jeweiliger Anteil kann allerdings nicht exakt vorhergesagt werden.

### Betrachtung der Anisotropien

Bei magnetischen Nanoteilchen ist die beobachtete Hyperfeinfeldaufspaltung entscheidend von der gesamten Anisotropie und von dem Volumen des Teilchens (Kapitel 2.2) abhängig. Dominierend sind dabei der Kristallanisotropieterm (Gleichung 2.49) und die durch die geometrische Anordnung hervorgerufene Interaktionsanisotropie (Gleichung 2.58). Vereinfacht für zwei identische Teilchen im Abstand  $r$  wird dies zu:

$$E = -\frac{\mu_0 \mu^2}{4\pi r^3} (1 + \cos^2(\theta)). \quad (3.16)$$

$\theta$  entspricht dann der Auslenkung aus der Verbindungsachse zwischen den beiden Teilchen [17]. Die gesamte Energie eines Teilchens entspricht dann:

$$E = KV \sin^2(\theta_1) - \frac{\mu_0 \mu^2}{4\pi r^3} (1 + \cos^2(\theta_2)). \quad (3.17)$$

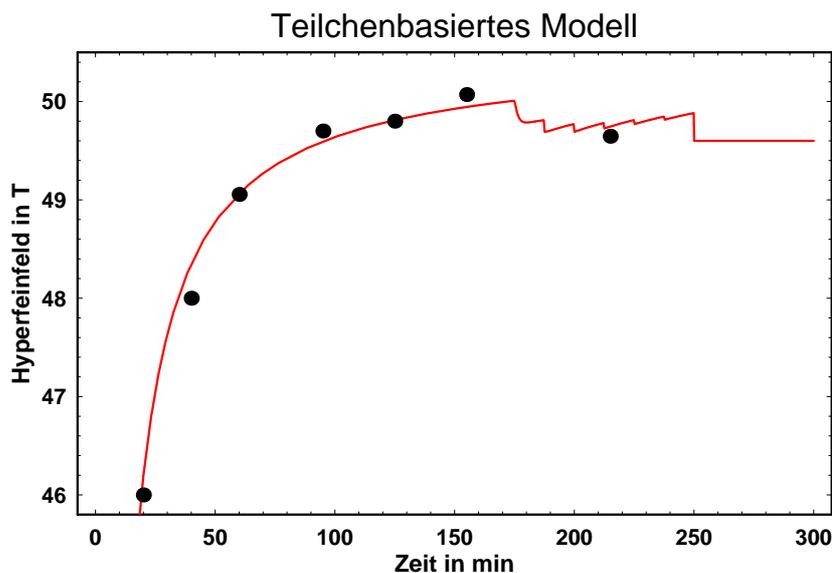


Abbildung 3.21: Modell 2

Die rote Kurve gibt die Simulation des Hyperfeinfeldverlaufs des Magnetit A Platzes wieder. Die schwarzen Punkte sind die in den Mössbauerspektren ermittelten Hyperfeinfelder. Diese Simulation basiert auf der Annahme der Aufteilung des Eiseneintrages auf verschiedene Magnetosomen.

Dabei ist  $\theta_1$  der Winkel der Auslenkung des magnetischen Momentes aus der Kristallvorzugsachse und  $\theta_2$  die Auslenkung aus der Verbindungsachse der beiden Teilchen.

Aus der Literatur [74, 50] ist bekannt, dass in *Aquaspirillum magnetotacticum* die Magnetosomen mit ihrer kristallographischen [111]-Achse entlang der Kettenachse und damit entlang der Verbindungsachse zwischen den Teilchen ausgerichtet sind. Im Magnetit ist die [111]-Achse die Vorzugsrichtung der Magnetisierung. Im Fall einer Magnetosomenkette kann somit die Gleichheit dieser beiden Winkel  $\theta_{1,2}$  angenommen werden.

Die Abbildung 3.24 zeigt einen Vergleich zwischen den Termen der Kristallanisotropie und der Interaktionsanisotropie. Für große Durchmesser ( $d > 40$  nm) und große Abstände ( $r > 3d$ ) ist die Kristallanisotropie entscheidend für die Beschreibung der Magnetisierungseigenschaften eines Teilchens. Bei geringen Abständen ( $r < 3d$ ) zwischen den Teilchen wird die Interaktionsanisotropie zum entscheidenden Term. Die Anisotropiekonstante selbst kann der Literatur entnommen werden [50].

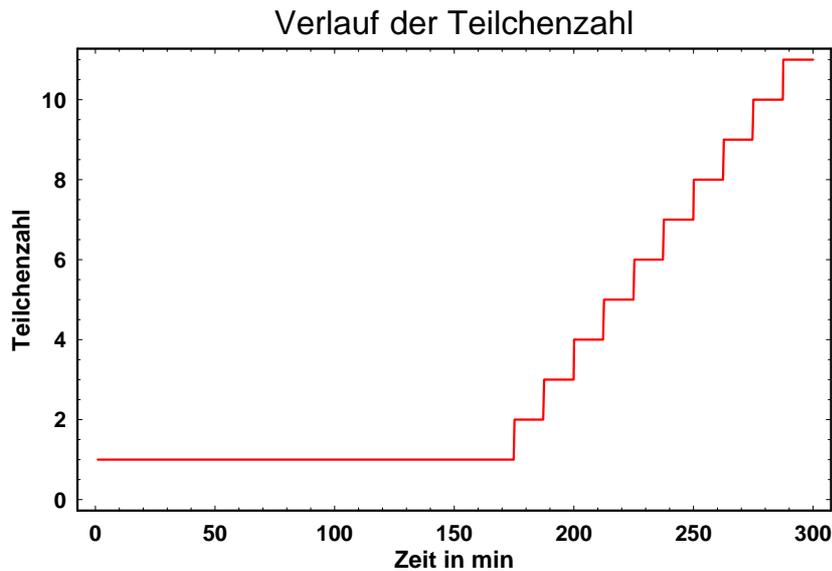


Abbildung 3.22: Modell 2: Teilchenzahlzunahme

Die rote Kurve gibt den Verlauf der angenommenen Teilchenzahl wieder.

### 3.5.2 Auftrennung der Bakterien

In allen bisher dargestellten Mössbauerspektren des Wildtyps konnten die Komponenten Magnetit und Ferritin nachgewiesen werden, sowie oftmals auch  $\text{Fe}^{2+}$ . Das Ferritin wurde dabei bisher nur anhand seiner Mössbauerparameter identifiziert. Der biochemische Nachweis ist bisher nicht erbracht worden. Die Auftrennung geht der Frage nach, ob es möglich ist, dieses Ferritin biochemisch zu isolieren und nachzuweisen.

Zur Identifizierung der an dem Biomineralisationsprozess beteiligten Komponenten wurden Zellen der Langzeitprobe DF23 (1230 min) durch eine Frenchpress aufgebrochen. Anschließend erfolgte die Auftrennung durch einen magnetischen Filter (MACS Column MS+ LOT 0581) in die magnetischen und die nichtmagnetischen Anteile der Probe. Der magnetische Anteil bildet die Probe DF23mag. Die Zentrifugation bei 37000 Umdrehungen pro Minute teilte den Durchlauf in eine Sedimentfraktion (Probe MS1) und den verbleibenden Überstand. Der Überstand wurde mit einem Filter (Porengröße von 100 kDa) filtriert. Der Überstand dieser Filtration ist die Probe MDC1 (Fraktion größer 100 kDa), der Durchlauf ein weiteres Mal filtriert (Porengröße 10 kDa) und der Überstand als MDC2 (Fraktion zwischen 10 kDa und 100 kDa) und der Durchlauf als MDC3 (Fraktion kleiner 10 kDa) bezeichnet. Die Wahl der Filtergrößen erfolgte unter der Annahme, ein großmolekulares Ferritin zu finden. Die Wahl des zweiten Filters sollte mögliche niedermolekulare Anteile weiter auftrennen.

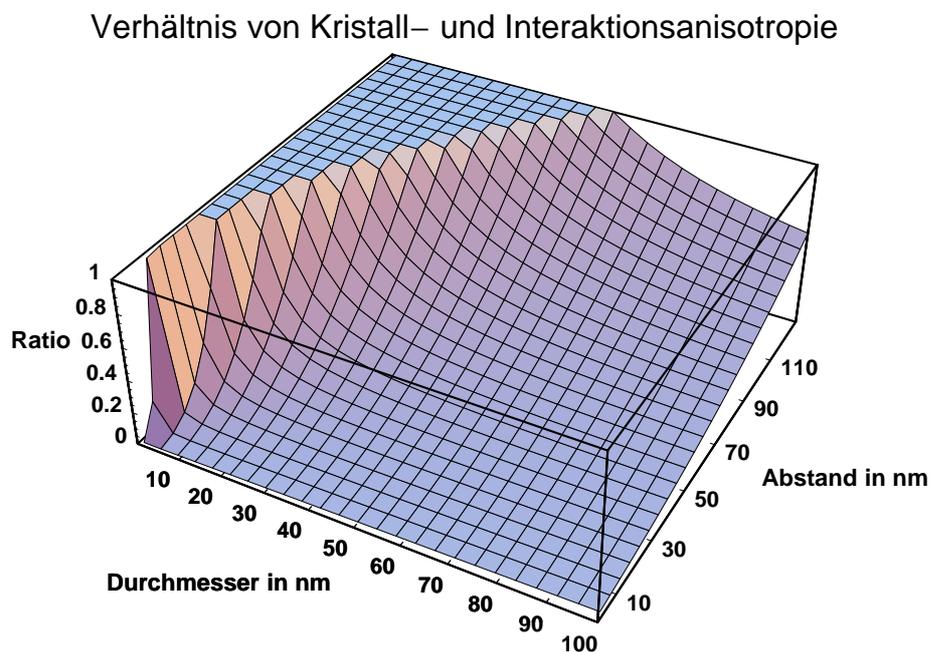


Abbildung 3.23: Vergleich zwischen Kristall- und Interaktionsanisotropie I  
 Dargestellt ist das Verhältnis des Terms Kristallanisotropie/Interaktionsanisotropie. Die Interaktionsanisotropie dominiert demnach in Bereichen, welche kleiner als 1 sind.

### Isolierte Magnetosomen

Das Mössbauerspektrum (Abb. 3.25) isolierter Magnetosomen (Probe DF23mag) zeigt bei  $T=130$  K zwei Sextetts, welche den Magnetitplätzen A und B zugeordnet werden. Weitere Komponenten sind in diesem Spektrum nicht auszumachen. Insbesondere ist hier auf die Abwesenheit von Dubletts im Zentrum des Spektrums hinzuweisen. Die Anpassung des Spektrums erfolgt mit den Parametern  $B_{hf,A} = 49,9$  T,  $\delta_A = 0,375$  mm/s, sowie  $B_{hf,B} = 47,9$  T,  $\delta_B = 0,76$  mm/s. Das Verhältnis zwischen den beiden Komponenten A und B ist 2:1.

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beiden Sextetts um Ferrihydrite handelt. Diese würden bei den hier auftretenden Partikelgrößen bei einer Temperatur von  $T=130$  K bzw. bei  $T=240$  K bereits superparamagnetisches Relaxationsverhalten zeigen und als Dublett im Mössbauerspektrum sichtbar werden [68]. Die magnetische Fraktion der Auftrennung enthält somit nur Magnetosomen.

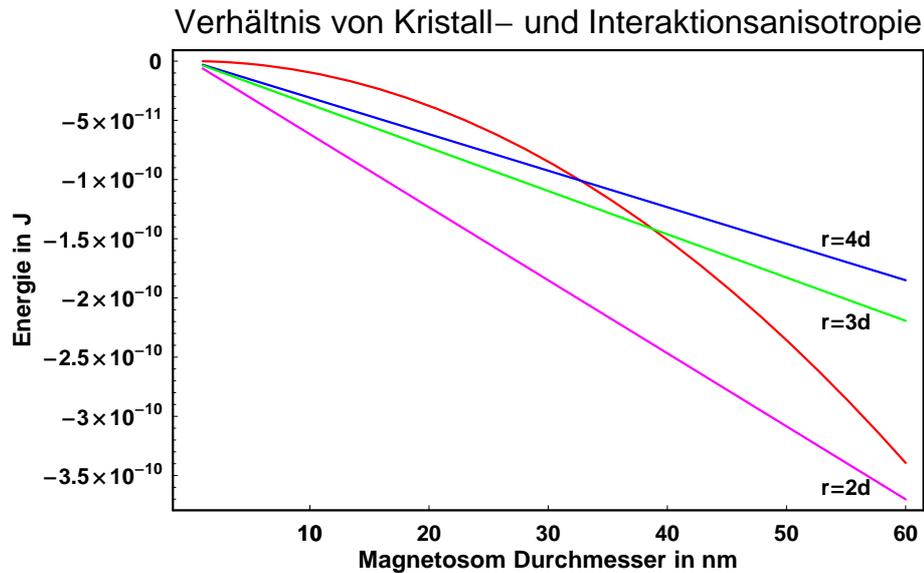


Abbildung 3.24: Vergleich zwischen Kristall- und Interaktionsanisotropie II  
 Hier werden für verschiedene Abstände (blau ( $r = 4d$ ), grün ( $r = 3d$ ), magenta ( $r = 2d$ )) die Terme der Interaktionsanisotropie mit dem Term der Kristallanisotropie (rot) verglichen;  $d$  ist der Durchmesser eines Teilchens.

## Sedimentfraktion

In den Abbildungen 3.27 (a) und (b) sind die Mössbauerspektren des Sediments (Probe MS1) aufgetragen. Es lassen sich sowohl das  $\text{Fe}^{2+}$  als auch die Ferritin Komponente identifizieren, ebenso eine aufgespaltene Komponente, welche sich durch die beiden Sextetts der Magnetit A und B Plätze anpassen lässt. Die Linienbreiten dieser beiden Komponenten liegen im Bereich zwischen  $1 \text{ mms}^{-1}$  und  $1,5 \text{ mms}^{-1}$ . Die Hyperfeinfelder ergeben sich für Platz A zu  $B_{hf,A}=46,8 \text{ T}$  bzw. für Platz B zu  $B_{hf,B}=44,8 \text{ T}$  mit Isomerieverschiebungen von  $\delta_A=0,38 \text{ mms}^{-1}$  und  $\delta_B=0,76 \text{ mms}^{-1}$ . Das Sediment enthält die Bruchstücke der Bakterienmembran. Das Ferritin und das  $\text{Fe}^{2+}$ , sowie das Magnetit mit geringer Hyperfeinfeldaufspaltung sind demnach membrangebundene Bestandteile. Aufgrund des geringen Hyperfeinfeldes der beiden Magnetitplätze ist davon auszugehen, dass es sich um kleine Magnetitpartikel mit Durchmessern unterhalb von  $6 \text{ nm}$  handelt (siehe Abschätzung des Durchmessers in Abbildung 3.18).

Dass Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$  in der Membran gebunden gefunden werden, ist sehr ungewöhnlich. Normalerweise finden sich diese Komponenten in der Cytoplasmafraktion von Zellen [78, 79].

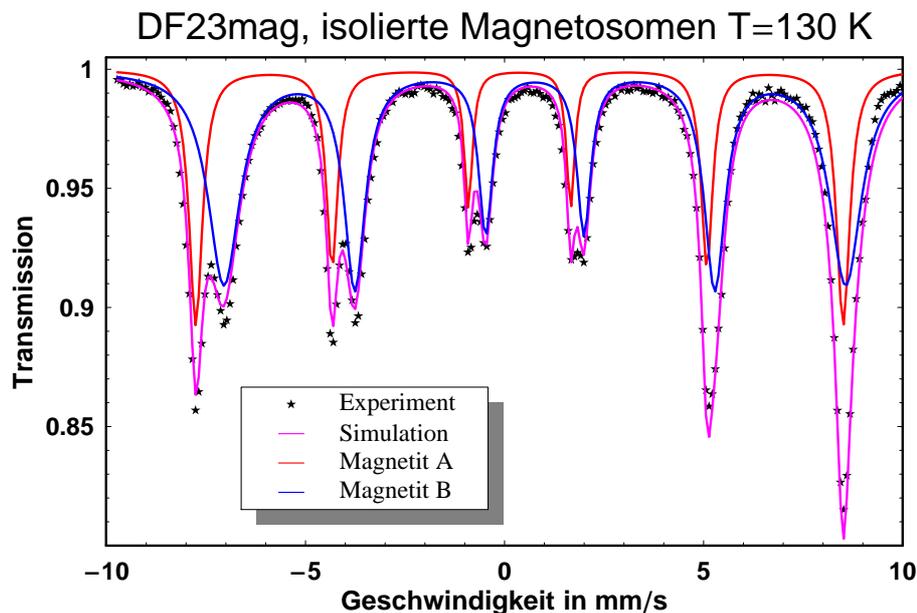
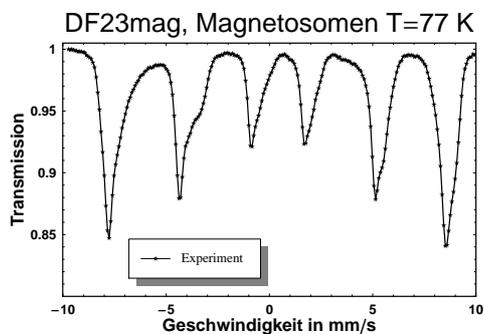
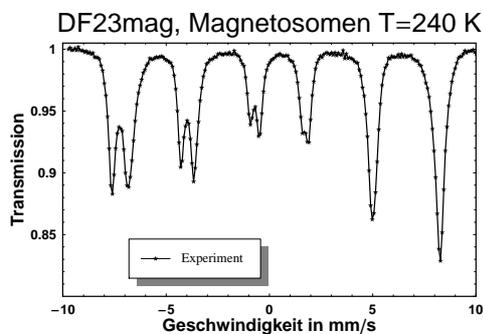


Abbildung 3.25: Mössbauerspektrum von isolierten Magnetosomen (Probe DF23mag) bei  $T=130$  K. Die schwarzen Sterne geben die experimentellen Daten wieder.



(a)  $T=77$  K



(b)  $T=240$  K

Abbildung 3.26: Spektren der isolierten Magnetosomen ( $T=77$  K und  $240$  K) Die schwarzen Sterne symbolisieren die Messpunkte. Das Spektrum bei  $T=77$  K zeigt Anzeichen für den bei Magnetit bekannten Verwey-Übergang unterhalb dessen langsame Elektronenrelaxation zwischen den beiden oktaedrischen B-Plätzen stattfindet. Das Spektrum bei  $T=240$  K zeigt zwar schnelle Elektronenrelaxation aber langsame superparamagnetische Relaxation.

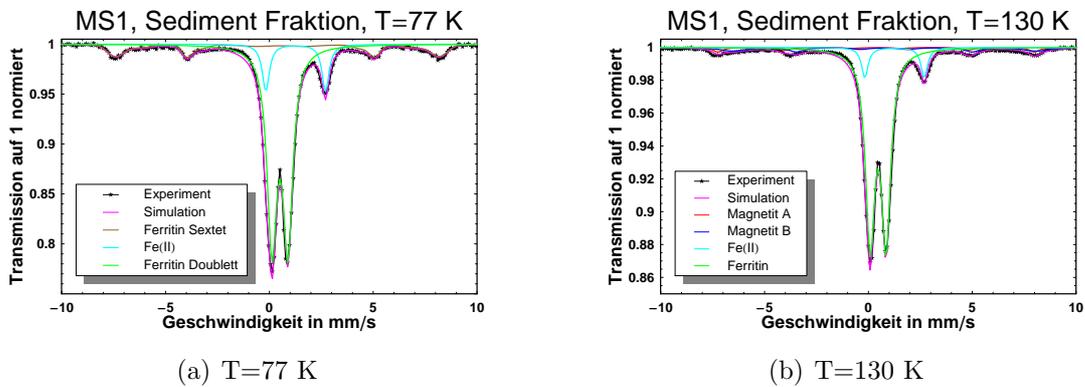


Abbildung 3.27: Spektren des Sediments aus DF23

Die schwarzen Sterne symbolisieren die Messpunkte, welche durch eine Führungslinie verbunden sind.

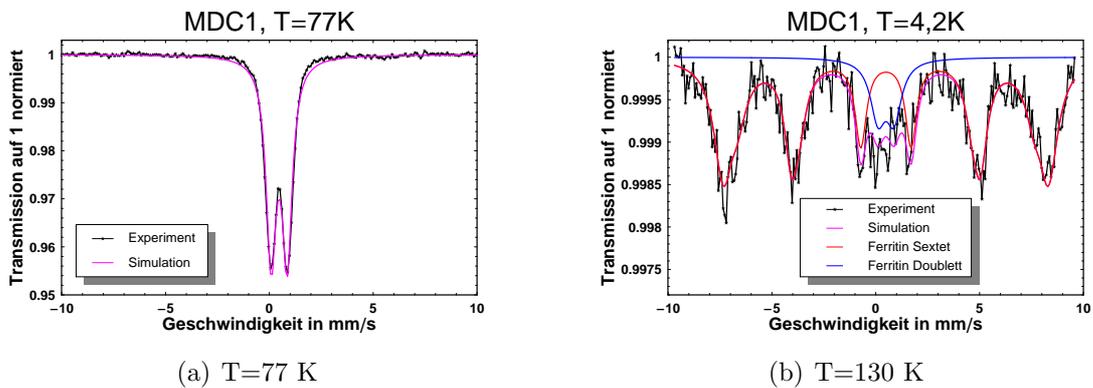


Abbildung 3.28: Mössbauerspektrum des Überstandes der 100 kDa Membran

Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, die magentafarbene Linie die Simulation.

### Fraktion größer 100 kDa

Im Spektrum des Überstandes der 100 kDa Membran (Abb. 3.28a) wird bei  $T = 77$  K eine Komponente identifiziert, welche durch die Parameter  $\delta = 0,47 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,81 \text{ mm}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,81 \text{ mm}^{-1}$  beschrieben werden kann. Es wird kein Magnetit in dieser Fraktion beobachtet. Bei einer Temperatur von  $T = 4,2$  K spaltet sich das Spektrum auf und bildet ein Sextett mit  $\delta = 0,47 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0 \text{ mm}^{-1}$  und  $B_{hf} = 47,4$  T. Eine genaue Parameterbestimmung des Sextetts, insbesondere einer von Null verschiedenen Quadrupolaufspaltung, ist aufgrund der geringen Absorption nicht möglich.<sup>5</sup> Im mittleren Bereich bleibt ein Rest der Dublettstruktur erhalten. Die Anpassung dieses Dubletts erfolgte mit den Parametern der Messung bei 77 K. Die magnetische Aufspaltung des Dubletts bei tiefen Temperaturen sowie die bestimmten Mössbauerparameter sind ein starker Hinweis auf die Existenz von Ferritin in der untersuchten Probe [80]. Bakterielle Ferritine zeigen in der Regel eine Aufspaltung unterhalb von 4,3 K während tierische und pflanzliche Ferritine einen superparamagnetischen Übergang zwischen 4,3 K und 77 K aufweisen. Der Unterschied beruht auf dem höheren Phosphatanteil in bakteriellem Ferritin, das zu einer geringeren Kristallinität des biogenen Ferrihydrits führt [80, 68].

### Fraktion größer 10 kDa

In der Abbildung 3.29 ist das Mössbauerspektrum der Probe MDC2 dargestellt. Das Spektrum zeigt, dass in dieser Fraktion keine eisenhaltigen Bestandteile nachweisbar sind.

### Durchlauf

In Abbildung 3.30 sind die Spektren der Probe MDC3 für drei verschiedene Temperaturen ( $T = 4,2$  K, 77 K und 130 K) dargestellt. Bei  $T = 130$  K kann eine magnetische Komponente und ein Dublett identifiziert werden. Für das Dublett ergibt ein Fit die Parameter:  $\delta = 0,44 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,71 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,34 \text{ mms}^{-1}$ . Bei  $T = 77$  K verändern sich diese Parameter leicht zu:  $\delta = 0,45 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,68 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,34 \text{ mms}^{-1}$ . Das Dublett ist auch noch bei  $T = 4,2$  K zu identifizieren und ergibt:  $\delta = 0,46 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,65 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,4 \text{ mms}^{-1}$ .

Die magnetische Struktur lässt sich nicht durch die bisher verwendeten Ferritin- und Magnetitsimulationen anpassen. Ein Fit mit einem Spin-Hamiltonian für ein Spin  $S = 5/2$  System ergibt:  $\delta = 0,46 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0 \text{ mms}^{-1}$ ,  $E/D = 0,4$ ,  $D = 1,1 \text{ cm}^{-1}$  sowie den Tensor  $A_{xx,yy,zz} = 217$  T. Die Linienbreite geht von  $\Gamma_{130K} = 1,7 \text{ mms}^{-1}$  über  $\Gamma_{77K} = 1,3 \text{ mms}^{-1}$  zu  $\Gamma_{4,2K} = 0,7 \text{ mms}^{-1}$ . Das Verhältnis zwischen den beiden Komponenten ändert sich praktisch nicht und liegt bei circa 1 : 9, ist aber durch die

---

<sup>5</sup>Das Spektrum der Probe MDC1 bei  $T = 4,2$  K wurde von dem Restmaterial erstellt, welches bei der biochemischen Untersuchung nicht aufgebraucht wurde. Aus diesem Grund ist die Absorption des 4,2K Spektrums um den Faktor 20 schwächer.

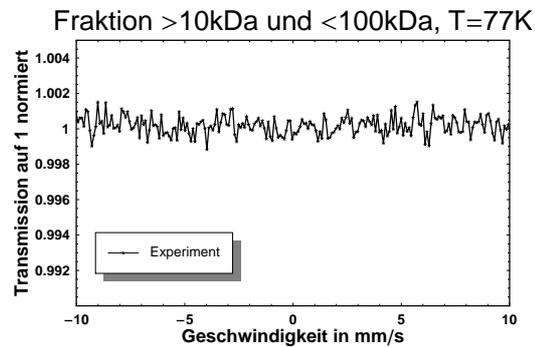


Abbildung 3.29: Mössbauerspektrum der Probe MDC2 bei  $T=77\text{ K}$   
Die schwarzen Sterne entsprechen den Messpunkten. Die Probe MDC2 enthält keine nachweisbaren Eisenbestandteile.

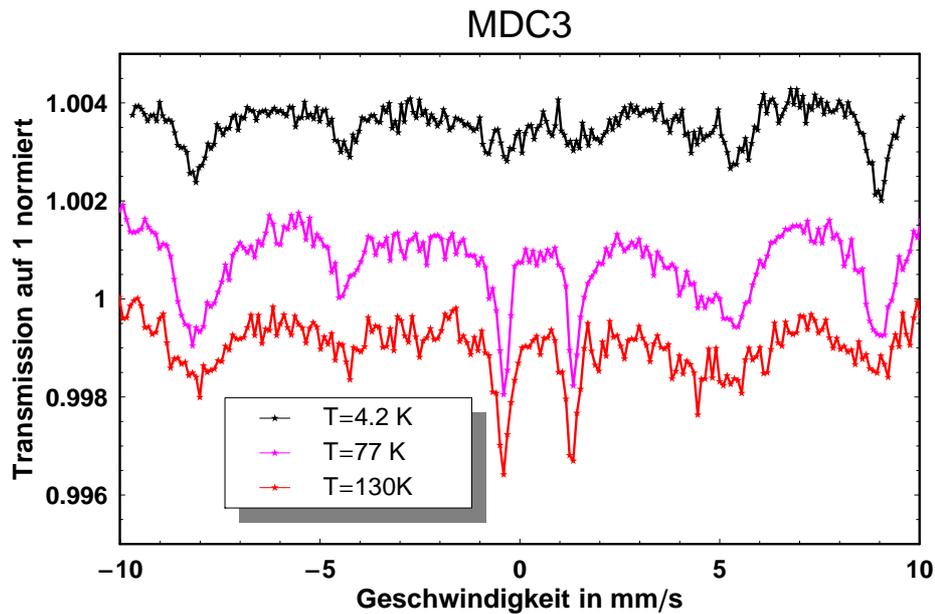


Abbildung 3.30: Mössbauerspektren der Probe MDC3 bei verschiedenen Temperaturen  
Die Messpunkte sind als Sterne eingetragen. Der Offset der Spektren beträgt je 0,002 Einheiten.

Statistik nicht ausreichend bestimmbar, um eine Veränderung sicher auszuschließen. Die identischen Isomerieverschiebungen legen nahe, es könne sich bei dem Dublett um den relaxierten Anteil des magnetischen Sextetts handeln.

Eine mögliche Erklärung für diese Komponente könnten Siderophore sein. Diese biologischen Chelatoren werden typischerweise von Bakterien produziert, um Eisen aufzunehmen und zeigen in Mössbauerspektren ein  $S=5/2$  Spektrum [81, 57] und ein Relaxationsverhalten. Bisher konnten allerdings keine Siderophore bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* nachgewiesen werden [36].

### Native und SDS Gel-Elektrophorese der Fraktionen

Zwei native Gele<sup>6</sup> mit Coomassie-Färbung und mit Fridovich-Färbung<sup>7</sup> wurden von dem Sediment (Slot A und C)) und dem Überstand (Slot B und D)) bei unterschiedlicher Zentrifugation angefertigt und sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Zum Vergleich ist ein Ferritin aus der Pferdemiilz aufgetragen (Slot E). Die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt zu: Slot A =  $6,3 \mu\text{g Fe/mg Protein}$ , Slot B =  $12,9 \mu\text{g Fe/mg Protein}$ , Slot C =  $17,8 \mu\text{g Fe/mg Protein}$  und Slot D =  $9,1 \mu\text{g Fe/mg Protein}$ . In Abbildung 3.32 sind die gleichen Proben in einem SDS-PAGE Gel<sup>8</sup> aufgetragen.

Das native Gel mit der Coomassie-Färbung (Abbildung 3.31i) zeigt für die Slots A-D gefärbte Banden mit ähnlicher Masse wie die des Vergleichsferritins aus der Pferdemiilz. In der Fridovich-Färbung (Abbildung 3.31ii) zeigt sich, dass diese Proteinbanden eisenhaltig sind und ebenfalls von ähnlichem Molekulargewicht wie das Vergleichsferritin.

In dem SDS-PAGE Gel (Abbildung 3.32), in welchem die Ferritine in ihre Untereinheiten aufgespalten sind, zeigen sich für das Sediment und den Überstand mehrere Banden, von denen eine zwischen 14,4 kDa und 20 kDa liegt, ebenso wie die Untereinheiten des Vergleichsferritin. Neben dieser Ferritinbande zeigt sich auch eine deutliche Bande bei circa 45 kDa, welche nicht in dem Vergleichsferritin enthalten ist.

### 3.5.3 Konversionselektronen Mössbauerspektroskopie

Um die Frage nach einer Vorstufe des Magnetits direkt auf der Oberfläche der Magnetosomen zu beantworten, wurden von den isolierten Magnetosomen (Probe DF23Mag) auch Konversionselektronen-Mössbauerspektren (CEMS) erstellt.<sup>9</sup> Das

---

<sup>6</sup>Die Gele wurden im Isotopenlabor der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck angefertigt.

<sup>7</sup>Fridovich Färbung: Diaminobenzoesäure  $(\text{H}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COOH} + \text{H}_2\text{O}_2$  ergibt eine schwarze Färbung von Eisen.

<sup>8</sup>SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

<sup>9</sup>In diesem Kapitel wurden die Transmissionsspektren nach Umwandlung durch folgende Formel umgestellt:  $R = -1 \cdot (T - 1)$ .  $T$  sei das Transmissionsspektrum.

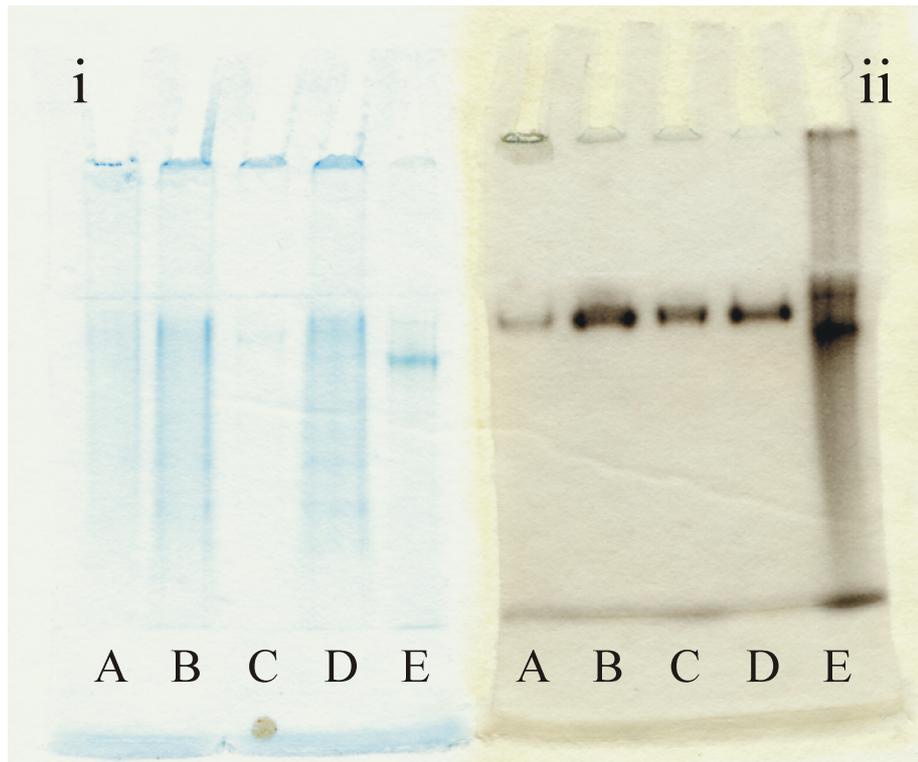


Abbildung 3.31: Native Gel-Elektrophorese der Fraktionen

A: Sediment, zentrifugiert bei  $5 \cdot 10^3$  g; B: Überstand, zentrifugiert bei  $5 \cdot 10^3$  g; C: Sediment, ultrazentrifugiert bei  $2 \cdot 10^5$  g; D: Überstand, ultrazentrifugiert bei  $2 \cdot 10^5$  g und E: Vergleichsferritin der Pferdemicz. i) Coomassie-Färbung, ii) Fridovich-Färbung.

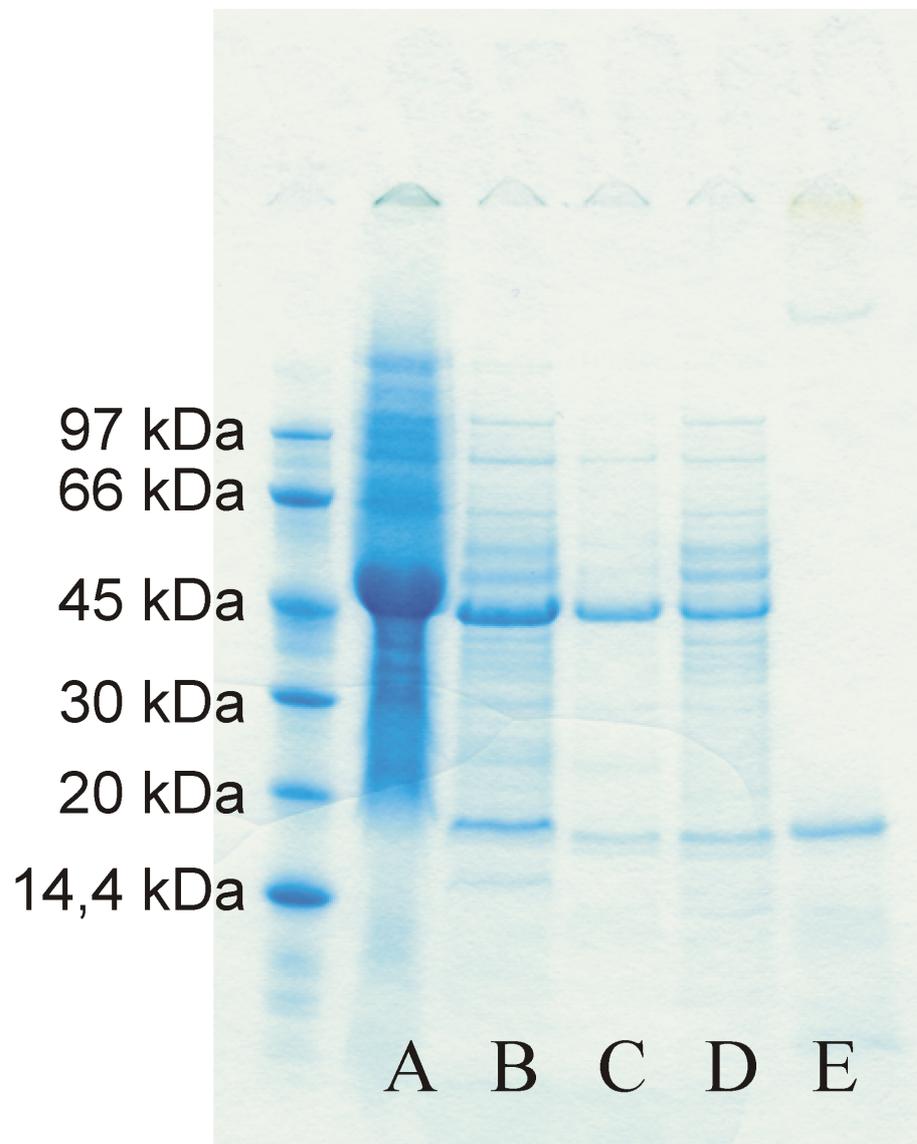


Abbildung 3.32: SDS-PAGE Gel-Elektrophorese der Fraktionen

A: Sediment, zentrifugiert bei  $5 \cdot 10^3$  g; B: Überstand, zentrifugiert bei  $5 \cdot 10^3$  g; C: Sediment, ultrazentrifugiert bei  $2 \cdot 10^5$  g; D: Überstand, ultrazentrifugiert bei  $2 \cdot 10^5$  g und E: Vergleichsferritin der Pferdemilz. i) Coomassie-Färbung, ii) Fridovich-Färbung.

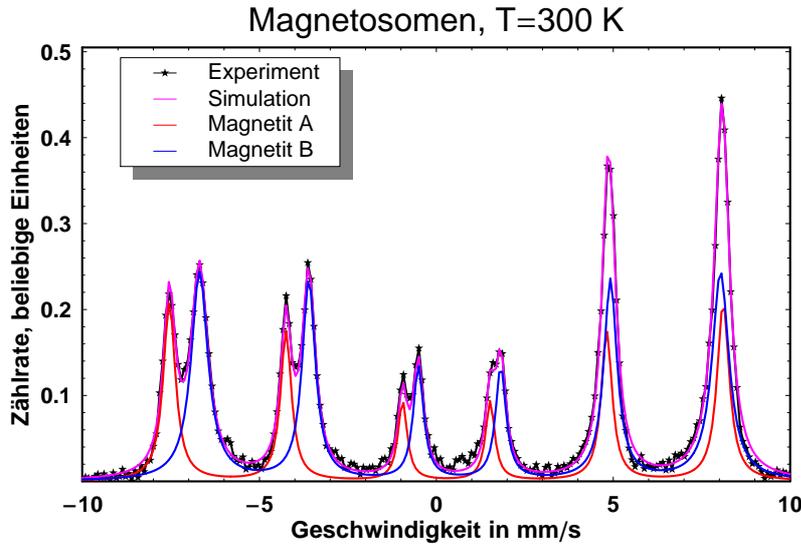


Abbildung 3.33: CEMS-Spektrum der isolierten Magnetosomen.

Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, die roten und blauen Linien die Simulationen der A und B Plätze des Magnetits. In Magenta ist die Gesamtsimulation dargestellt.

Auftauen und Aufbringen der Probe auf ein Leitpad<sup>10</sup> im CEMS-Detektor geschah in einer mobilen Glovebox unter Stickstoffatmosphäre. Der Detektor wurde anschließend evakuiert, um die Probe zu dehydrieren. Als Zählgas kam Aceton bei 25 mbar zur Anwendung. Der Aufbau befand sich an der Århus Universität (Prof. H.P. Gunnlaugsson, Institut für Physik und Astronomie, Dänemark).

In Abbildung 3.33 ist das aufgenommene CEMS-Spektrum mit der Simulation von Magnetit dargestellt. Das Spektrum kann mit dieser einen Simulations-Komponente erklärt werden. Spuren von Maghemit oder anderen Eisenoxiden sind nicht nachzuweisen. Die Abbildung 3.35 gibt einen Vergleich zwischen einem bei  $T=240$  K aufgenommenen Spektrum und dem bei circa  $T=305$  K aufgenommenen CEMS-Spektrum wieder. Der Vergleich lässt den Temperaturunterschied anhand der verschobenen Spektren und leicht unterschiedlicher Aufspaltung deutlich hervortreten. Die Unterschiede resultieren aus den temperaturabhängigen Isomerieverschiebungen und Hyperfeinfeldaufspaltungen. Im Bereich des Auflösungsvermögens der verwendeten Apparaturen kann nur Magnetit nachgewiesen werden.

Die Abbildung 3.34 zeigt das Spektrum nach einstündigem Luftkontakt. Eine

<sup>10</sup>Leitpad: leitfähiges, selbstklebendes Kohlenstoffplättchen

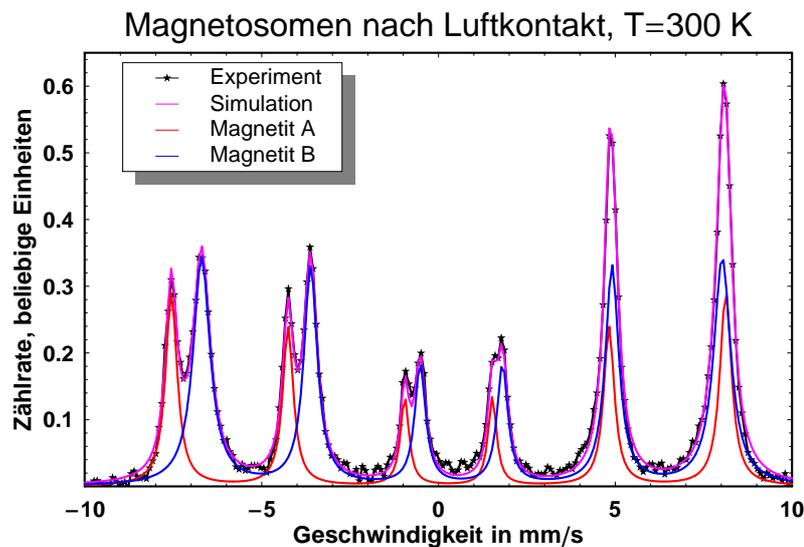


Abbildung 3.34: CEMS-Spektrum der Magnetosomen nach Luftkontakt  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder.

Änderung des Spektrums ist nicht ersichtlich. Daraus lässt sich schließen, dass die Magnetosomen gegenüber Sauerstoffeinfluss sehr stabil sind. Dies unterstützt die These, dass die Magnetosomen weiterhin von ihren Membranhüllen umgeben sind und dadurch keinen direkten Kontakt mit der Umgebungsluft haben.

Die CEMS-Probe wurde zwei Monate bei circa 25 mbar Aceton-Gas aufbewahrt und danach wurde ein Transmissionsspektrum aufgenommen. Dieses ist in Abbildung 3.36 dargestellt. Dieses Spektrum lässt sich ebenfalls durch eine einzige Magnetitkomponente darstellen. Allerdings gibt es deutliche Veränderungen im Vergleich zu den vorangegangenen Spektren. Eine mögliche Erklärung für die Veränderung liegt in der Zerstörung der Magnetosommembran durch das Acetongas. Ein signifikanter Übergang zu einem anderem Eisenoxid kann allerdings nicht beobachtet werden.

### 3.5.4 $\Delta\text{mamM}$ und $\Delta\text{mamB}$

Bei  $\Delta\text{mamM}$  und  $\Delta\text{mamB}$  handelt es sich um Mutanten, denen Gene entfernt wurden, welche sich in der Genregion der vermuteten Magnetitsynthese befinden [72]. Diese Voruntersuchungen rechnen die durch diese beiden Gene kodierten Proteine zu den Schwermetall-Transportproteinen. Von beiden Mutanten ist bekannt, dass sie nichtmagnetischer Natur sind. Im Mittelpunkt der Mössbaueruntersuchungen stand deshalb der Nachweis einer Vor- oder Zwischenstufe zur Magnetitsynthese.

Von den beiden Mutantenstämmen  $\Delta\text{mamM}$  und  $\Delta\text{mamB}$  wurde je eine Wachstumsreihe mit den Zeitpunkten 1 h, 3 h und 20 h angefertigt. Die Mössbauerspektren

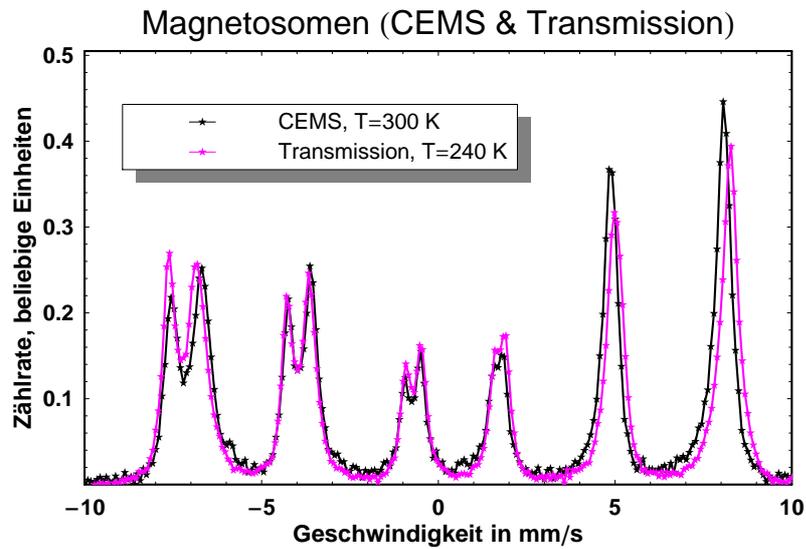


Abbildung 3.35: Vergleich zwischen CEMS und Transmissionspektrum der Magnetosomen

Die schwarzen Sterne geben die CEMS, die magentafarbenen Sterne die Transmissionsdaten wieder.

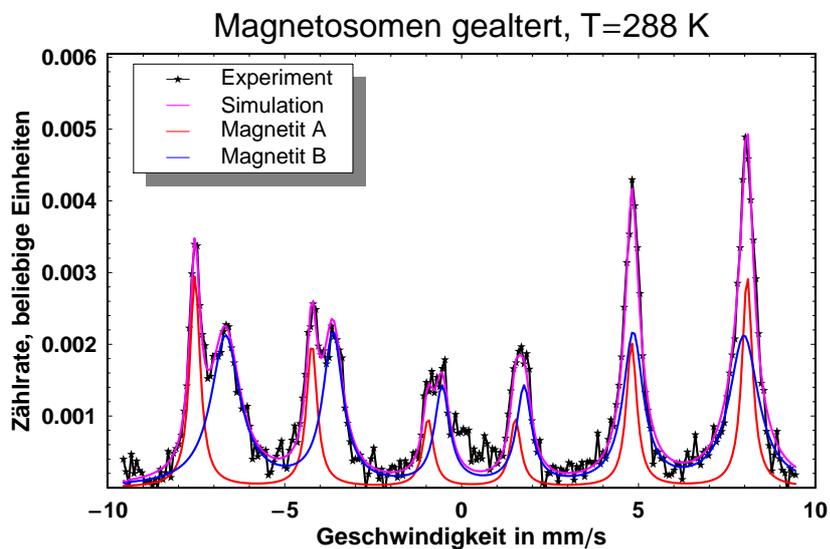


Abbildung 3.36: Transmissionsspektrum der gealterten Magnetosomen Probe

Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder.

Tabelle 3.5: Parameter der CEMS-Spektren. Die drei Werte der Linienbreite beziehen sich jeweils auf die Linien 1:6, 2:5 und 3:4.

	Magnetosomen $T = 300$ K	nach Luftkontakt	gealtert
$\delta_A$ in $\text{mms}^{-1}$	0,28	0,28	0,27
$\delta_B$ in $\text{mms}^{-1}$	0,66	0,65	0,62
$\Delta E_{Q,A}$ in $\text{mms}^{-1}$	0	0	0
$\Delta E_{Q,B}$ in $\text{mms}^{-1}$	0	0	0
$\Gamma_A$ in $\text{mms}^{-1}$	0,38 / 0,31 / 0,30	0,38 / 0,31 / 0,29	0,35 / 0,35 / 0,35
$\Gamma_B$ in $\text{mms}^{-1}$	0,65 / 0,44 / 0,40	0,65 / 0,44 / 0,41	1,01 / 0,66 / 0,51
$B_{hf,A}$ in T	48,5	48,6	47,9
$B_{hf,B}$ in T	45,6	45,6	44,9

sind in Abbildung 3.37 wiedergegeben.

Beide Mutanten bilden auch nach 20 h kein Magnetit. Es sind in allen Fällen nur  $\text{Fe}^{2+}$  high-spin und Ferritin zu identifizieren. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten der beiden Mutanten kann nicht festgestellt werden. Insofern blockiert die Gendelektion der mamB- und mamM-Gene im Bakterium bezüglich der Magnetitbildung den gleichen Mechanismus. Eine spezielle Vorstufe zur Magnetitsynthese kann nicht identifiziert werden. Interessant ist bei beiden Mutanten die kontinuierliche Umwandlung des  $\text{Fe}^{2+}$  in Ferritin, wobei die Mutante  $\Delta\text{mamB}$  im Laufe von 20 h doppelt soviel Ferritin produziert wie  $\Delta\text{mamM}$ . Der absolute Anteil des  $\text{Fe}^{2+}$  in den Bakterien bleibt dabei über die Zeit konstant.

### 3.5.5 Wachstum in Abhängigkeit vom Medium

#### MSR-1 unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Das Spektrum bei  $T=130$  K ist in Abbildung 3.38 dargestellt und zeigt *M. gryphiswaldense* unter aeroben Wachstumsbedingungen. Die für *M. gryphiswaldense* typischen Komponenten (Magnetit, Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$ ) können in dem Spektrum identifiziert werden. Das Magnetit hat einen Flächenanteil (A und B Plätze) von circa 64,3%, das Ferritin von 29,7% und das  $\text{Fe}^{2+}$  von circa 6%. Das Hyperfeinfeld der Magnetit A Komponente ist  $B_{hf,aerob}=48,8$  T. Sowohl die  $\text{Fe}^{2+}$  Komponente als auch die Ferritin Komponente sind deutlich ausgeprägt und nehmen circa 35% des Gesamtspektrums ein.

In Abbildung 3.39 ist der gleiche Stamm unter microaeroben Wachstumsbedingungen gezeigt. Auch hier können Magnetit, Ferritin und  $\text{Fe}^{2+}$  identifiziert werden. Die Flächenverhältnisse sind in diesem Fall allerdings 88,2%(Magnetit) : 10,4% (Ferritin) : 1,4% ( $\text{Fe}^{2+}$ ) unter ansonsten gleichen Bedingungen. Der Aufbau von Magnetit ist

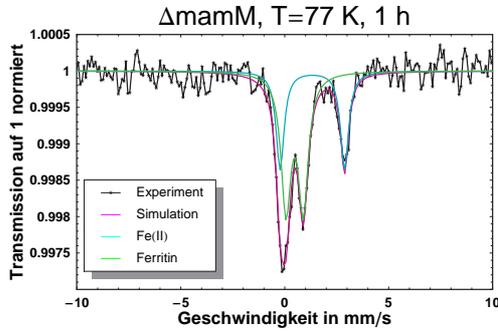
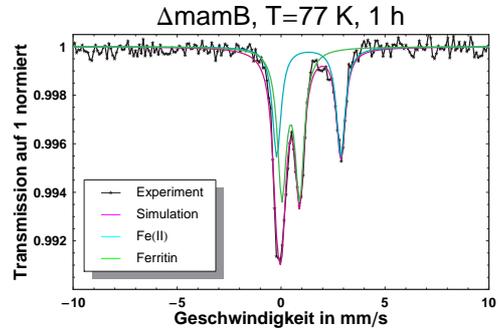
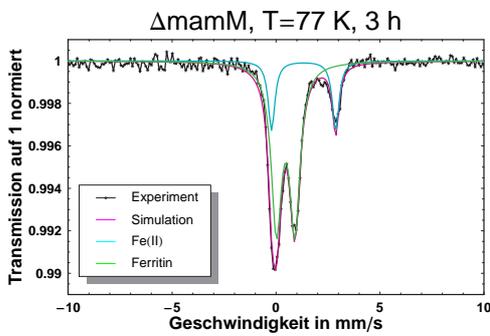
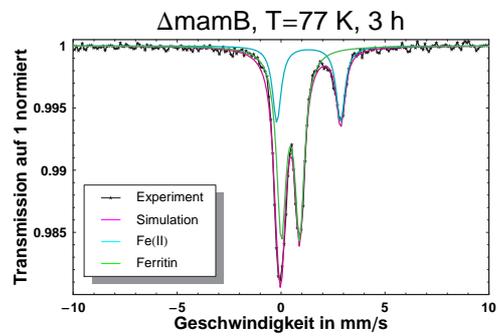
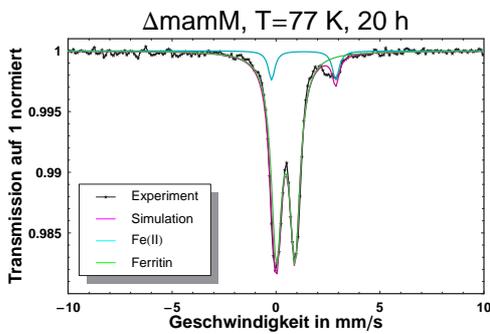
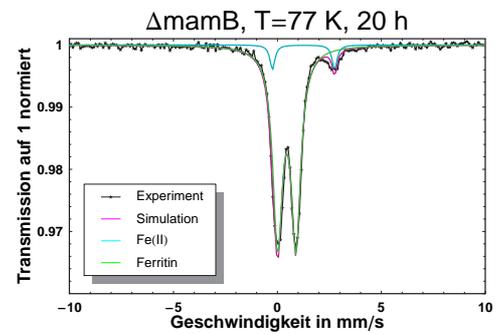
(a)  $\Delta\text{mamM}$  nach 1 h(b)  $\Delta\text{mamB}$  nach 1 h(c)  $\Delta\text{mamM}$  nach 3 h(d)  $\Delta\text{mamB}$  nach 3 h(e)  $\Delta\text{mamM}$  nach 20 h(f)  $\Delta\text{mamB}$  nach 20 h

Abbildung 3.37: Mössbauerspektren der Wachstumsreihen der  $\Delta\text{mamM}$  und  $\Delta\text{mamB}$  Mutanten

Die linke Spalte stellt von oben nach unten den Verlauf des Wachstums bei  $\Delta\text{mamM}$  dar, die rechte den von  $\Delta\text{mamB}$ .

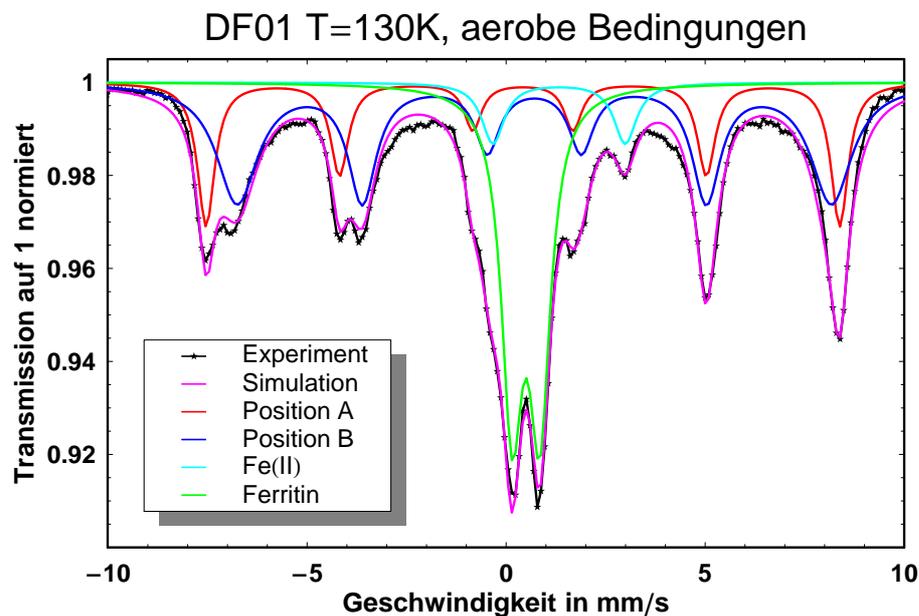


Abbildung 3.38: Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder und sind mit Führungslinien verbunden.

unter sauerstoffarmen Bedingungen stark begünstigt. Das Spektrum ist bedingt durch die Dicke der Probe ( $> 30\%$  Absorption) gedämpft, was sich durch Abweichungen vom Fit bei den stärksten Linien bemerkbar macht.<sup>11</sup> Der  $\text{Fe}^{2+}$  und Ferritin-Anteil in dieser Probe ist auf circa 12% zurückgegangen. Das Hyperfeinfeld der Magnetit A Komponente steigt in dieser Probe auf  $B_{hf,aerob}=49,4$  T.

### MSR-1 in verschiedenen Medien

Das Mineral Magnetit besteht sowohl aus  $\text{Fe}^{2+}$  als auch aus  $\text{Fe}^{3+}$  Ionen. Für ein Bakterium stellt es einen Energieaufwand dar, Ionen zu reduzieren bzw. zu oxidieren. Daher ist anzunehmen, dass zur Synthese des Magnetits bevorzugt solche Eisenionen verwendet werden, welche mit geringem Energieaufwand bereitgestellt werden können. Wird dem Bakterium nur eine Sorte Eisenionen im Medium bereitgestellt, so ist zu erwarten, dass es die fehlende Sorte Ionen nur im benötigten Maße selbst generiert. Aus dem Verhalten lassen sich somit Aussagen über die im Bakterium vorhandenen Eisenpools treffen.

Alle in diesem Unterkapitel behandelten Proben wurden mit einer natürlichen Eisenisotopenmischung angefertigt.

<sup>11</sup>Durch zu stark angereicherte Proben, kann es zu Mehrfachstreuung und Absorption kommen. Dies ergibt eine Minderung des beobachtbaren Anteils [69].

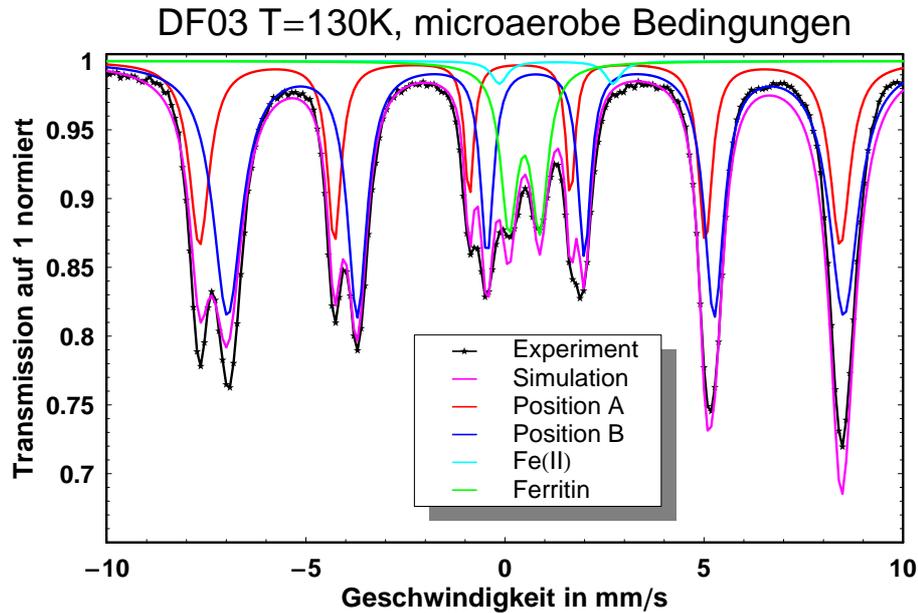


Abbildung 3.39: Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder und sind mit Führungslinien verbunden.

Für die Mössbaueruntersuchungen standen drei Proben zur Verfügung, die verschiedene Nährmedien und Sauerstoffkonzentrationen aufweisen. Die Probe DF40 wurde unter aeroben Bedingungen mit  $\text{Fe}^{3+}$  im Nährmedium angezogen, die Probe DF41 ebenfalls mit  $\text{Fe}^{3+}$ , aber in einer microaeroben Umgebung. Für die Probe DF42 standen eine microaerobe Umgebung und ein  $\text{Fe}^{2+}$  Nährmedium bereit. Die Spektren aller drei Proben sind in Abbildung 3.40 dargestellt.

In der Probe DF41 kann keine Magnetitbildung nachgewiesen werden. Die Bildung der Ferritinkomponente zeigt allerdings, dass die Bakterien in der Lage sind zu existieren und auch Eisen aufzunehmen.

In der Probe DF41 können mit Sicherheit Magnetit und Ferritin ausgemacht werden. Der Fit liefert einen Anteil von 0,4% an  $\text{Fe}^{2+}$ , welches allerdings im Bereich des Rauschens liegt. Die Bildung von Magnetit in dieser reinen  $\text{Fe}^{3+}$  Umgebung ist ein klarer Beleg für die Existenz eines Reduktionsapparates in den Bakterien. Die Ferritin Komponente macht circa 50% der gesamten Fläche aus. Das Hyperfeinfeld der Magnetit A Komponente steigt in dieser Probe auf  $B_{hf,aerob}=49,2$  T.

Wird das Anzuchtmedium von  $\text{Fe}^{3+}$  auf  $\text{Fe}^{2+}$  geändert, so ändert sich auch das Spektrum erheblich.  $\text{Fe}^{2+}$  ist in dieser Probe nicht vorhanden. Der Anteil der Ferritin Komponente sinkt auf 17%. Das Hyperfeinfeld der Magnetit A Komponente zeigt nur eine Aufspaltung von  $B_{hf,aerob}=48,8$  T. Die Existenz von Magnetit ist demnach ein klarer Beweis für die Existenz eines Oxidationsapparates in dem Bakterium.

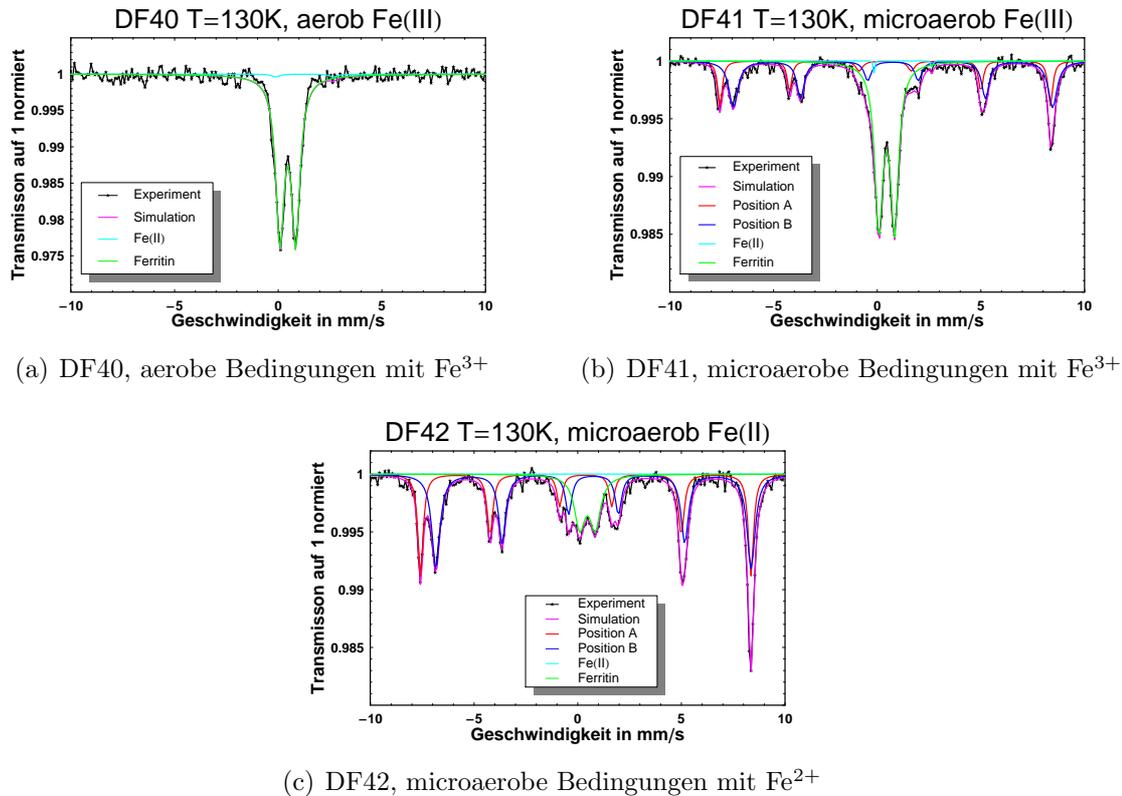


Abbildung 3.40: Mössbauerspektren der Graphen von Wachstum in verschiedenen Medien unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.

Da sowohl im Fe<sup>3+</sup>-Medium als auch im Fe<sup>2+</sup>-Medium das Magnetit gebildet wird, liegt die Vermutung nahe, dass der gesamte Prozess der Magnetitsynthese über einen internen Eisenpool vonstatten geht und nach Bedarf Fe<sup>2+</sup> und Fe<sup>3+</sup> im Bakterium zur Verfügung gestellt wird. Dabei ist, abhängig davon, ob das Eisen als Fe<sup>2+</sup> oder Fe<sup>3+</sup> vorliegt, unterschiedlicher Energieaufwand nötig.

Im aeroben Fall wird das Eisen als Ferritin im Bakterium angereichert (siehe Abbildung 3.40(a)). Eine Magnetitbildung findet nicht statt. Ist Fe<sup>2+</sup> im Nährmedium, wird nur wenig Ferritin gebildet, dafür aber viel Magnetit. Ist nur Fe<sup>3+</sup> im Nährmedium vorhanden, wird sehr viel Ferritin gebildet und nur wenig Magnetit.

Der Prozess der Bildung von Magnetit ist im Fall von Fe<sup>2+</sup> bevorzugt. Dies ist insofern erstaunlich, als dass Magnetit stöchiometrisch aus nur 8 Fe<sup>2+</sup>, aber aus 16 Fe<sup>3+</sup>-Ionen besteht. Die Synthese von Fe<sup>2+</sup> aus Fe<sup>3+</sup> stellt somit für das Bakterium einen energetisch wesentlich ungünstigeren Prozess dar.

Dies ist durchaus verständlich, wenn als allgemeiner Eisenpool ein Ferritinapparat angenommen wird. Liegt im Medium nur Fe<sup>2+</sup> vor, so kann dieses sowohl direkt

in benötigten Prozessen verwendet werden und über den allgemeinen Eisenpool das  $\text{Fe}^{3+}$  bereit gestellt werden. Im Fall von vorhandenem  $\text{Fe}^{3+}$  muss dieses erst in einem Redox-Schritt in den allgemeinen Eisenpool eingebracht werden, bevor aus diesem dann  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  synthetisiert werden kann.

### 3.5.6 Zusammenfassung

#### Wachstumsverhalten

Das Wachstumsverhalten zeigt zwei verschiedene Phasen: In der ersten Phase werden Magnetosomen isoliert gebildet und in ihrem Volumen vergrößert. Diese Phase lässt sich in der TEM direkt beobachten. In Abbildung 3.9 ist ersichtlich, dass der Übergang circa 160 min nach der Eiseninduktion stattfindet.

Die Daten aus der MIDL lassen sich ebenfalls durch den Übergang eines Bakteriums von einem nicht magnetischen zu einem magnetischen Bakterium beschreiben. Der Fit auf diese Daten ergibt für den Übergang eine Zeit von circa 145 min nach der Eiseninduktion.

Die Mössbauerspektroskopie erlaubt die Verfolgung der Magnetitanteile im Bakterium und deren Charakterisierung. Ein besonderer Aspekt stellt hierbei die Beobachtung der zeitlichen Variation des Hyperfeinfeldes der Magnetit A Komponente dar (Komponente B analog). Durch das Wachstum verändert sich das Volumen der Magnetosomen und dadurch ihre Hyperfeinfeldaufspaltung. Zusätzlich bilden sie im Laufe der Zeit eine Kette aus.

Die Untersuchungen an den Fraktionen des magnetotaktischen Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* zeigten, dass die Magnetosomen aus reinem Magnetit mit einem stöchiometrischen Verhältnis 1:2 (A und B Plätze) bestehen. Im Rahmen der Untersuchungen konnten keine Anteile von Ferrihydriten ausgemacht werden. Ferrihydrite hätten bei höherer Temperatur relaxierende Spektren und damit eine Dublettstruktur oberhalb von 130 K ergeben müssen [68]. In der Fraktion der Magnetosomen konnte eine solche Struktur nicht nachgewiesen werden.

In der Fraktion mit einem Molekulargewicht oberhalb von 100 kDa konnte eine eisenhaltige Komponente identifiziert werden, welche durch die Mössbauerparameter ihr temperaturabhängiges Verhalten und durch den Nachweis im Fridovich Gel einem Ferritin zugeordnet werden konnte. Frankel *et al.* [82] vermuteten, es könne sich bei dieser Komponente um ein anorganisches Ferrihydrit handeln. Der Nachweis, dass diese Komponente an ein Protein mit einer molekularen Masse ähnlich einem bekannten Ferritin gekoppelt ist, lässt ein kristallines Ferrihydrit unwahrscheinlich erscheinen. Gewöhnlich beginnen Bakterioferritine [68] ihre magnetische Aufspaltung erst im Bereich von circa 10 K, wobei auch Beispiele bekannt sind, bei denen die Aufspaltung erst unterhalb von 4 K einsetzt. In der Sedimentprobe konnte ebenfalls ein Anteil einer magnetisch aufgespaltenen Komponente identifiziert werden. Diese Komponente wird kleinen noch membrangebundenen Magnetitvesikeln zugerechnet,

deren Durchmesser unterhalb von circa 6 nm liegt. Ferrihydrite oder Ferritine zeigen bei  $T=130$  K keine magnetisch aufgespaltenen Mössbauerspektren mehr und können deshalb als Erklärung ausgeschlossen werden [68].

In der Fraktion kleiner als 10 kDa können zwei unterschiedliche Komponenten ausgemacht werden. Die Parameter des Sextetts lassen auf ein  $\text{Fe}^{3+}$  high-spin System schließen. Eine Vermutung wäre, dass es sich bei diesem Sextett um ein Siderophor handelt. Allerdings konnten auf biochemischem Weg solche Siderophore nicht nachgewiesen werden [61, 83]. Bei dem Dublett in dieser Probe könnte es sich um die relaxierende Komponente zu dem Sextett handeln. Eine eindeutige Temperaturabhängigkeit zwischen den beiden Komponenten konnte nicht festgestellt werden.

Die Untersuchung der beiden Mutanten  $\Delta\text{mamM}$  und  $\Delta\text{mamB}$  zeigt, dass diese noch die Fähigkeit zur Bildung von Ferritin besitzen. Zudem zeigt die  $\Delta\text{mamB}$  Mutante eine fast doppelt so große Eisenaufnahme wie die  $\Delta\text{mamM}$  Mutante.

In den Untersuchungen zum Wachstumsverhalten konnte der Verlauf der Eisenaufnahme dargestellt werden. Das Wachstum und die Zunahme der Zahl der Magnetosomen spiegelt sich in einem kontinuierlichen Anwachsen des Hyperfeinfeldes der Magnetit-Komponente wieder, bis es in dem Bakterium zu einer Kettenbildung kommt und die damit einsetzende geometrische Anordnung das Hyperfeinfeld erniedrigt. Diese Beobachtung lässt sich durch die TEM-Aufnahmen und die MIDL-Untersuchungen stützen. Es konnte ein Modell für das beobachtbare Hyperfeinfeld gefunden werden, welches eine Reduktion in der gleichen Größenordnung vorhersagt. Bei der Betrachtung der Ferritin- und  $\text{Fe}^{2+}$ -Anteile zeigt sich, dass diese kurz nach der Eisenzugabe sprunghaft ansteigen und sich dann auf ein annähernd gleich bleibendes Niveau einstellen.

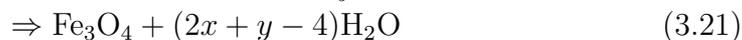
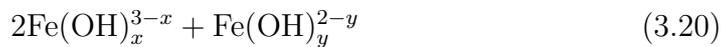
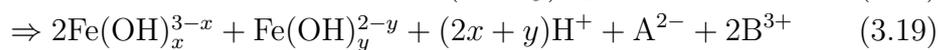
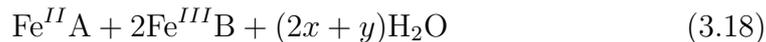
In den  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Nährmedien zeigte sich bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. In der Probe mit dem aeroben  $\text{Fe}^{3+}$  Medium war kein Magnetit nachzuweisen. In microaerober Umgebung bildete sich sowohl in  $\text{Fe}^{2+}$ - als auch in  $\text{Fe}^{3+}$ -Nährlösung Magnetit. Dies legt nahe, dass das Bakterium einen allgemeinen Eisenpool bildet und aus diesem dann erst das Magnetit produziert.

Die Betrachtung der Magnetosomen in CEMS diente der höheren Nachweisempfindlichkeit von Oberflächenschichten durch die begrenzte Austrittstiefe der Elektronen. Ein Vergleich mit den Spektren aus der Transmissionsspektroskopie liefert keinen Hinweis auf andere Bestandteile außer Magnetit. Eine Oxidation der Proben durch ein zweistündiges Einwirken von Raumluft auf die Probe hat die Spektren nicht verändert. Dies ist der Beweis für die noch intakte Vesikelhülle der Magnetosomen in der aufgetrennten Probe.

#### **Wachstumsmodell**

Auf Grundlage der Untersuchungen lässt sich ein Modell für die Entstehung des Magnetits in *Magnetospirillum gryphiswaldense* aufstellen (siehe auch Abbildung 3.41):

1. Die Aufnahme von  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen erfolgt aus dem umgebenden Medium. Dies folgt aus den Experimenten zur Aufnahme von Eisen mittels verschiedener Nährmedien, wie es in Kapitel 3.5.5 (Seiten 66ff) dargestellt ist.
2. Die  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen werden als Ferritin gespeichert und sind in/an der Membran gelagert.  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen werden ebenfalls in der Membran eingelagert, in Form einer nicht bekannten Verbindung. Die Auftrennung der Bakterien und Isolierung des Ferritins und die Identifikation einer membranständigen  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente sind auf den Seiten 51ff im Kapitel 3.5.2 dargelegt.
3. Die Bildung von Magnetit durchläuft keine Vorstufe, die in signifikantem Maße im Bakterium vorkommt. In keiner der untersuchten Proben konnte eine mögliche Vorstufe von Magnetit identifiziert werden.
4. Magnetit entsteht in einem aus der Cytoplasmamembran gebildeten Vesikel [84] im alkalischen Medium:



Dieses Reaktionsmodell ergibt sich aus der Annahme, dass sich das Magnetit unter thermodynamischen Bedingungen spontan in dem Vesikel aus der  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente und dem Ferritin bildet. Dazu ist ein alkalisches Medium mit einem pH größer als 8 notwendig [68]. Zur Realisierung eines solchen pH-Wertes, ist es denkbar, dass der Organismus über Protonenpumpen verfügt und über eine Möglichkeit den Vesikelansatz vom Periplasma zu trennen.

5. Nachdem sich kleine Magnetitkristalle gebildet haben, löst sich das Vesikel von der Cytoplasmamembran [72, 48]. In den Membranfraktionen der Auftrennung konnten Magnetitkristalle mit reduziertem Hyperfeinfeld identifiziert werden. Dies belegt die Existenz von Kristallen mit Ausdehnungen von unter 6 nm in der Membran. Der Prozess der Loslösung setzt erst zu einem späteren Zeitpunkt ein. Die Untersuchung der isolierten Magnetosomen zeigt schließlich, dass ausgewachsene Magnetosomen nicht mehr in der Membran eingelagert, aber noch von ihrer Vesikelmembran umgeben sind.
6. Die Magnetosomen werden schließlich zu einer Kette aufgereiht, wo sie ihre Funktion als Orientierungshilfe übernehmen.

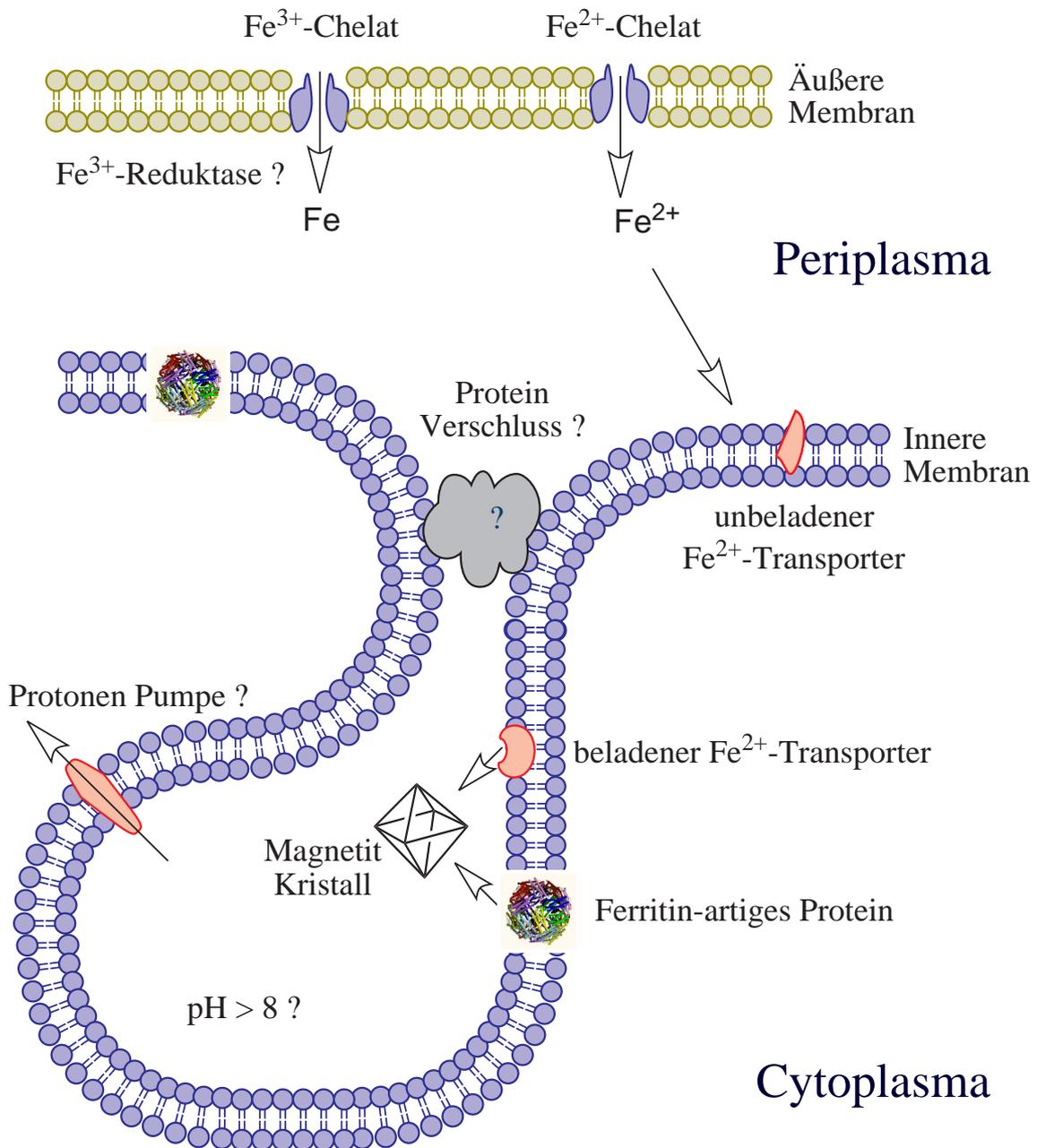


Abbildung 3.41: Modell der Magnetosomenstehung

Die Fe<sup>3+</sup>- und Fe<sup>2+</sup>-Chelate werden durch die äußere Membran ins Periplasma transportiert. Aus der inneren Membran bildet sich ein Vesikelansatz, in welchem die Fe<sup>2+</sup>-Transporter und die Ferritine ihr Eisen abgeben können und unter geeigneten Bedingungen Magnetit bilden.

# 4 Proteine GcpE und LytB

## 4.1 Isopren

Isopren ( $C_5H_8$ , 2-Methyl-1,3-Butadien) ist ein Molekül, welches in der Natur häufig als elementarer Baustein in verschiedenen Syntheseyklen ausgemacht werden kann [85]. Als Beispiele seien hier die Steroide oder Terpene [86] zu nennen, welche aus Isopentenyl-Diphosphat (IPP) oder der dazu isomeren Verbindung 3,3-Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aufgebaut sind. Auch die Vitamine A und  $\beta$ -Carotin [87, 88] sind aus Isopren aufgebaut. Der im Tierreich bekannte Acetat-Mevalonat-Syntheseweg (MAP) konnte auch bei bestimmten Pflanzen [89] nachgewiesen werden. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass es einen alternativen Reaktionsweg zur Isoprenoid-Synthese gibt [90, 91, 92]. Bei diesem neuen 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweg (MEP) werden aus den Grundstoffen Pyruvat und Glyceraldehyd-3-Phosphat die Isoprene synthetisiert. In diesem Reaktionsweg treten die beiden Proteine GcpE [92] und LytB [93] auf (siehe Bild 4.1), welche beide je einen  $[4Fe-4S]^{2+}$  Cluster enthalten.

GcpE katalysiert die Reaktion von Cyclodiphosphat zu (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat (HMBPP) [91, 94]. Im anschließenden Reaktionsschritt tritt das Protein LytB auf und katalysiert die Reaktion unter Abspaltung eines Hydroxylrestes zu Isopentenyl-Diphosphat und dem isomeren 3,3-Dimethylallyl-Diphosphat [90]. Dieser neuartige Syntheseweg wurde kürzlich auch in Pflanzen nachgewiesen [95, 96].

Bisher konnte nur nachgewiesen werden, dass es sich bei den beiden Proteinen um  $[4Fe-4S]$  Clusterhaltige Eisen-Schwefel-Proteine handelt [97, 93]. Eine Charakterisierung dieser beiden Proteine wurde in dieser Arbeit vorgenommen.

## 4.2 GcpE

### 4.2.1 Rekonstituiertes Protein GcpE

Bei den Proben des rekonstituierten Proteins handelt es sich um mit natürlichem<sup>1</sup> Eisen gebildete Proteine, welchen durch einen chemischen Schritt das natürliche Eisen entzogen wurde. Das eisenfrei Apo-Protein wurde anschließend mit  $^{57}Fe$  rekonstituiert. Die Probe G ist das ansonsten unbehandelte Protein. Bei der Probe GE handelt es

---

<sup>1</sup>natürliches Eisen: natürliche Isotopenmischung

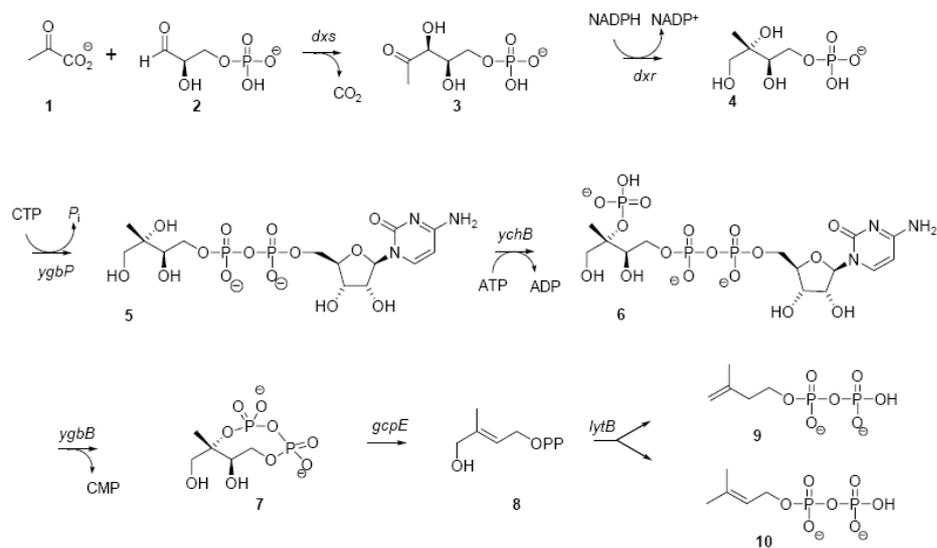


Abbildung 4.1: Reaktionspfad der 2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthese [96]

**1** Pyruvat, **2** D-Glyceraldehyd-Phosphat, **3** 1-Deoxy-D - xylulose-5-Phosphat, **4** 2-C-methyl-D-erythritol 4-Phosphat, **5** 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D -erythritol, **6** 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol 2-Phosphat, **7** 2-C-methyl-D-Erythritol 2,4-Cyclodiphosphat (MEcDP), **8** 4-Hydroxy-2-Methylbut-2-Enyl 1-Phosphat (HMBPP), **9** Isopentenyl-Diphosphat (IPP), **10** Dimethylallyl-Diphosphat (DMAPP).

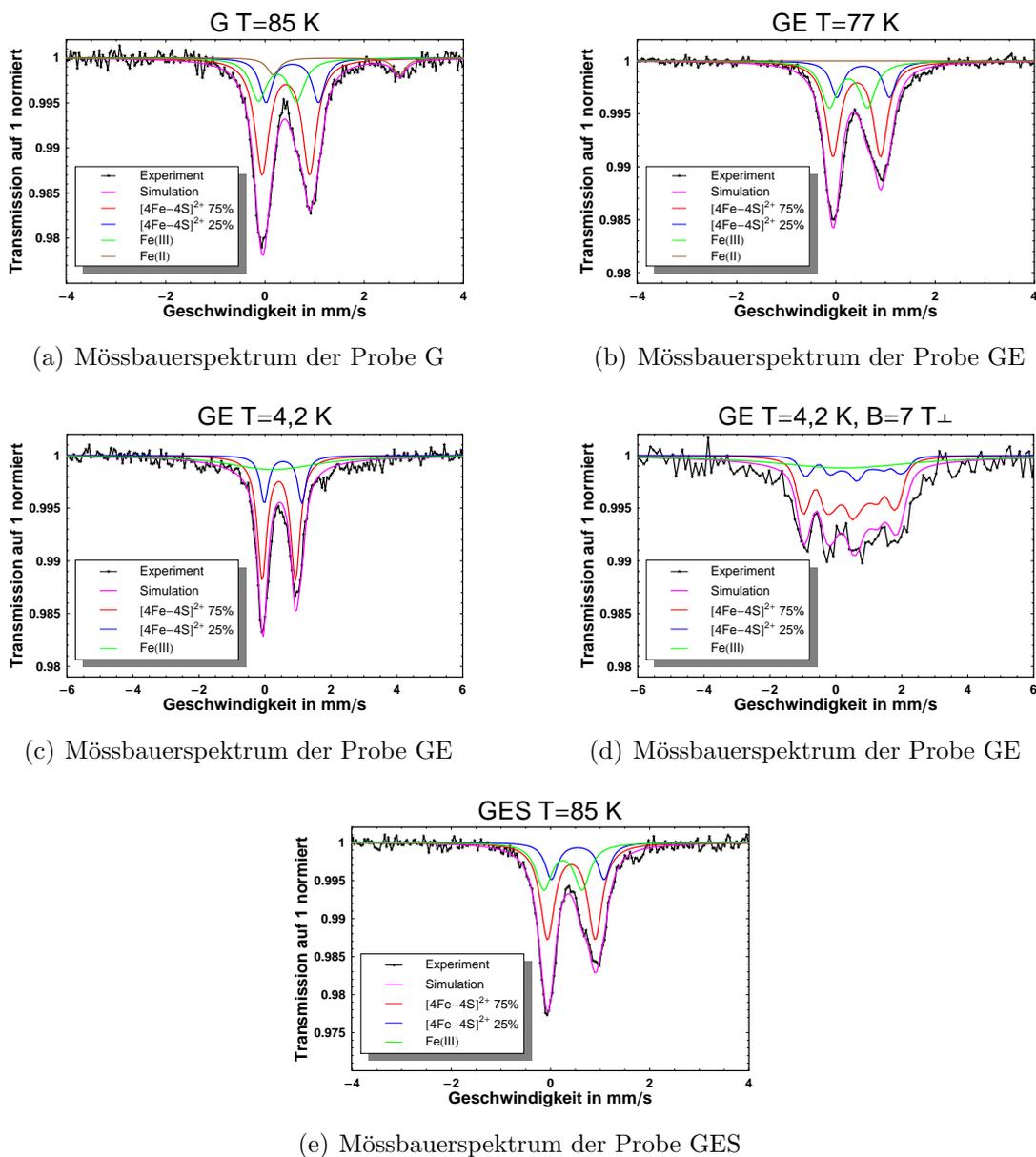


Abbildung 4.2: Mössbauerspektren des rekonstituierten Proteins GcpE

(a) nicht aufgereinigte GcpE, (b) mit EDTA gereinigtes GcpE bei  $T = 77$  K, (c) mit EDTA gereinigtes GcpE bei  $T = 4,2$  K ( $B=20$  mT), (d) mit EDTA gereinigtes GcpE bei  $T = 4,2$  K und senkrechtem Magnetfeld  $B = 7$  T, (e) GcpE mit Substrat.

sich um das durch EDTA aufgereinigte Protein und bei GES um das aufgereinigte Protein mit dem Substrat.

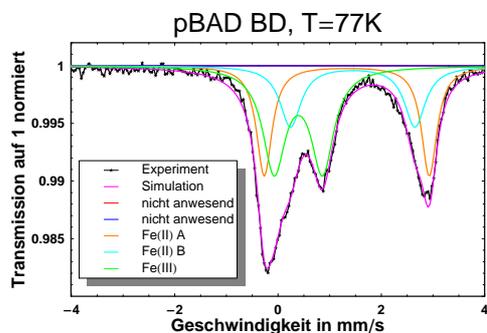
Die Mössbauerspektren zeigen eine asymmetrische Dublettstruktur, welche sich mit vier Komponenten im Falle der Probe G und je drei Komponenten im Falle der Proben GE und GES anpassen lassen. Alle Proben dieser Serie wurden mit den gleichen Parametern bei  $T=77\text{ K}$  und  $85\text{ K}$  angepasst. In der Probe G kann ein  $\text{Fe}^{2+}$  high-spin identifiziert werden mit  $\delta=1,44\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=2,55\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,3\text{ mms}^{-1}$ . In allen drei Proben findet sich  $\text{Fe}^{3+}$  mit  $\delta=0,25\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=0,77\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,39\text{ mms}^{-1}$ , sowie ein Eisen-Schwefel-Cluster mit einer Komponentenverteilung von 3:1 und den Parametern  $\delta=0,42\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=0,96\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma=0,35\text{ mms}^{-1}$  sowie  $\delta=0,55\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=1,06\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,3\text{ mms}^{-1}$ . Der Fit wurde gleichzeitig auf alle Spektren angewandt. In dem Hochfeldspektrum bei  $B=7\text{ T}$  zeigt das Protein die für  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster typische diamagnetische Aufspaltung.

### 4.2.2 Das Protein GcpE in vivo

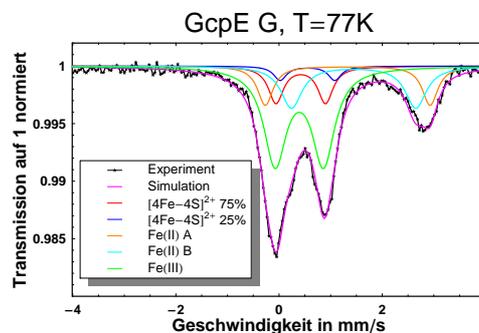
Zur Untersuchung des Clusters *in vivo* wurde das Protein GcpE in *E. coli* überexprimiert und diese Zellen dann durch die Mössbauerspektroskopie untersucht (Probe GcpE G). Als Referenz wurde der gleiche Zellstamm ohne die Überexprimierung des Proteins als Vergleichsprobe genutzt (Probe pBAD BD). Aus beiden gewonnenen Spektren wurde ein Differenzspektrum ermittelt, um die Beiträge der in beiden Zellen vorhandenen Komponenten zu minimieren. In Abbildung 4.3 werden die Mössbauerspektren und die Differenzen wiedergegeben. Die verwendeten Mössbauerparameter des Proteins sind die gleichen wie für das rekonstituierte Protein aus dem vorherigen Unterkapitel.

In den Zellen (Probe pBAD BD) ohne Überexprimierung kann das Protein GcpE nicht nachgewiesen werden und das Mössbauerspektrum lässt sich mittels zweier  $\text{Fe}^{2+}$  und einer  $\text{Fe}^{3+}$  Komponente anpassen. In der Probe mit Überexprimierung des Proteins GcpE (Probe GcpE G) verändert sich das Mössbauerspektrum sichtbar. Das Spektrum lässt sich mit den gleichen Komponenten wie sie sich für die Probe pBAD BD ergaben und den zusätzlichen zwei Komponenten des Proteins anpassen. Für diesen Fit wurden nur die Flächenanteile neu bestimmt. Die  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  Parameter ergaben mit der Verwendung der Probe pBAD BD:  $\delta=0,39\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,94\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,53\text{ mms}^{-1}$ , für das  $\text{Fe}^{2+}$  A:  $\delta=1,33\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 3,19\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,36\text{ mms}^{-1}$  und für  $\text{Fe}^{2+}$  B:  $\delta=1,45\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 2,41\text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,49\text{ mms}^{-1}$  mit den Parametern für  $T=77\text{ K}$  und  $4,2\text{ K}$ .

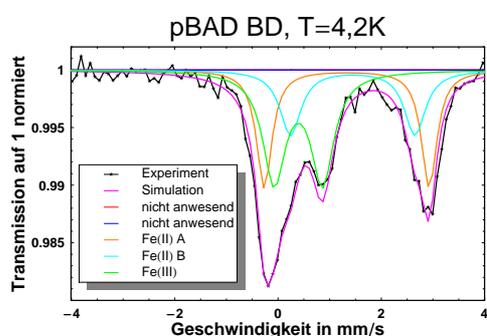
In den Differenzspektren zeigte sich, dass die relativen Anteile der  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  Komponenten nicht gleich sind. Daher ist eine völlige Eliminierung in den Differenzen nicht möglich und es wurde nur die Komponente  $\text{Fe}^{2+}$  A eliminiert.



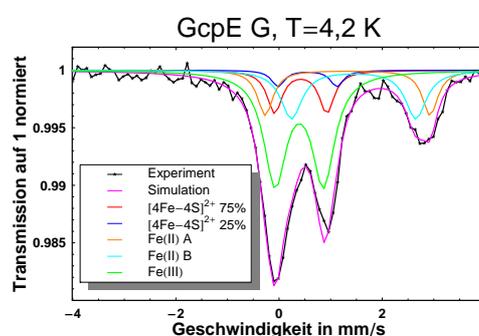
(a) Mössbauerspektrum der Probe pBAD BD



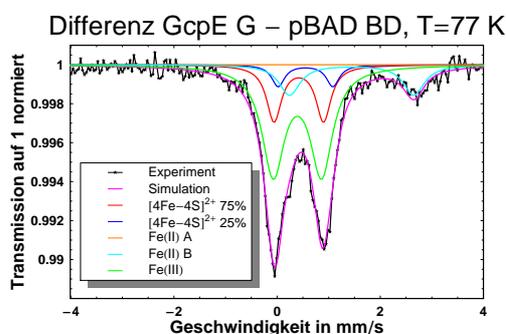
(b) Mössbauerspektrum der Probe GcpE G



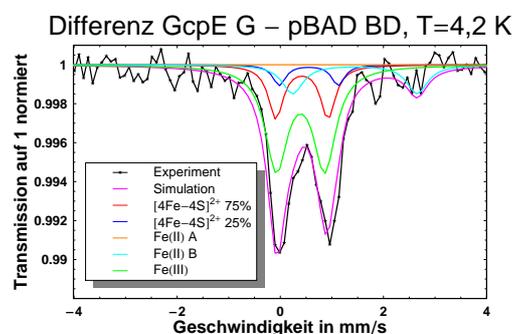
(c) Mössbauerspektrum der Probe pBAD BD



(d) Mössbauerspektrum der Probe GcpE G



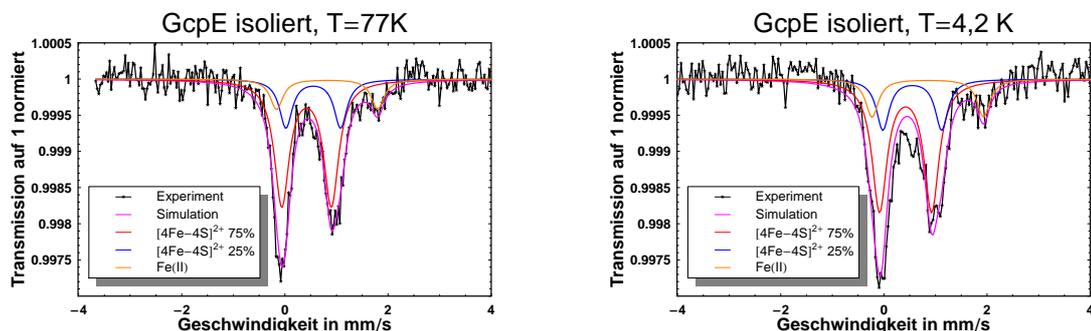
(e) Differenz der Mössbauerspektren bei T=77 K



(f) Differenz der Mössbauerspektren bei T=4,2 K

Abbildung 4.3: Mössbauerspektren der ganzen Zellen mit überexprimierten Protein GcpE

Die beiden untersten Spektren geben die Differenzen der beiden Spektren bei verschiedenen Temperaturen wieder.



(a) Mössbauerspektrum der Probe GcpE isoliert

(b) Mössbauerspektrum der Probe GcpE isoliert

Abbildung 4.4: Mössbauerspektren des isolierten Proteins GcpE

### 4.2.3 Das isolierte Protein GcpE

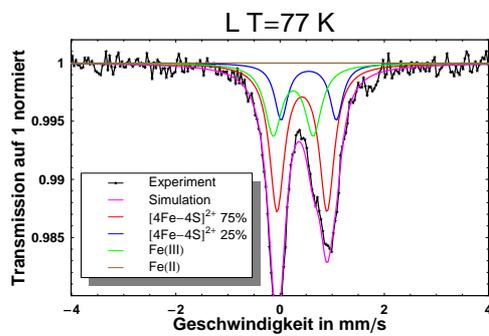
Aus den Zellen wurde das Protein GcpE isoliert und mittels der Mössbauerspektroskopie vermessen. In Abbildung 4.4 sind die Spektren bei zwei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. Die Parameter des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters sind dabei zu denen aus dem rekonstituierten Protein und denen der überexprimierten Zellen unverändert. Die Parameter des  $\text{Fe}^{2+}$  haben sich unter der Isolierung verändert und zeigen nun  $\delta=0,85 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=2,16 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,30 \text{ mms}^{-1}$ .

## 4.3 LytB

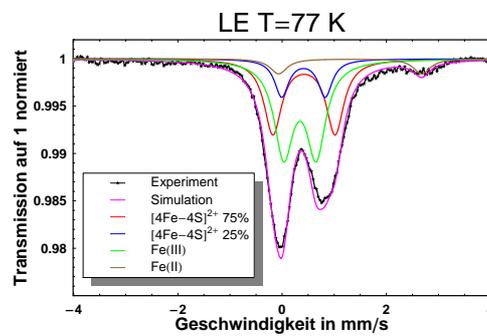
### 4.3.1 Rekonstituiertes Protein LytB

Die rekonstituierten Proteine wurden nachträglich mit  $^{57}\text{Fe}$  angereichert und durch Mössbauerspektroskopie vermessen. Die Probe L enthält das Protein LytB, die Probe LE ist zusätzlich mit EDTA versetzt und in der Probe LES wurde zusätzlich das Substrat hinzugefügt.

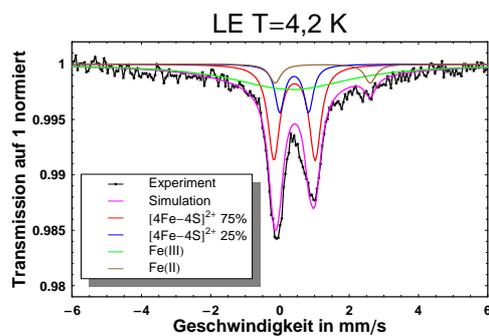
In den Mössbauerspektren der Probe L können vier Komponenten identifiziert werden. Ein  $\text{Fe}^{2+}$  high-spin mit den Parametern  $\delta=1,31 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=2,75 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,40 \text{ mms}^{-1}$ , ein  $\text{Fe}^{3+}$  mit  $\delta=0,34 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,62 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,44 \text{ mms}^{-1}$  und einen Eisen-Schwefel-Cluster mit den Parametern  $\delta = 0,42 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,19 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,41 \text{ mms}^{-1}$  für die 75%ige Komponente und  $\delta = 0,41 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,84 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,32 \text{ mms}^{-1}$  für die 25%ige Komponente. Die Spektren sind in Abbildung 4.5 dargestellt.



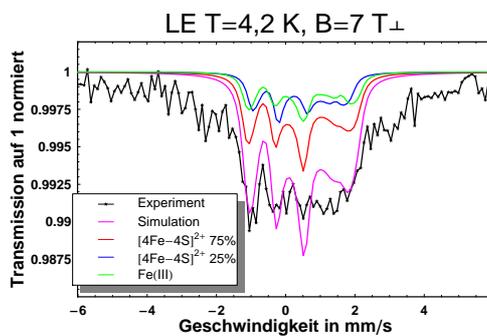
(a) Mössbauerspektrum der Probe L



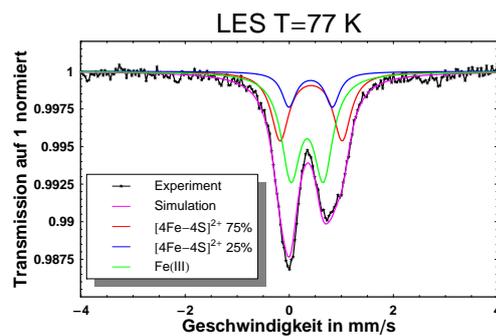
(b) Mössbauerspektrum der Probe LE



(c) Mössbauerspektrum der Probe LE

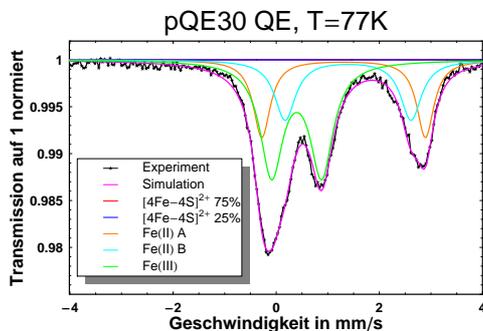


(d) Mössbauerspektrum der Probe LE

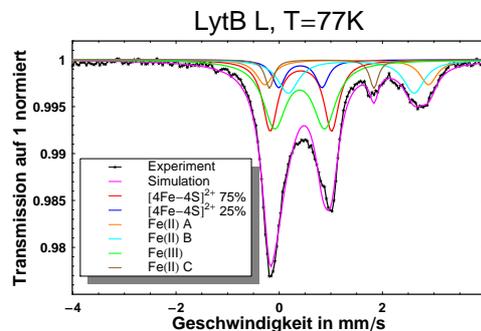


(e) Mössbauerspektrum der Probe LES

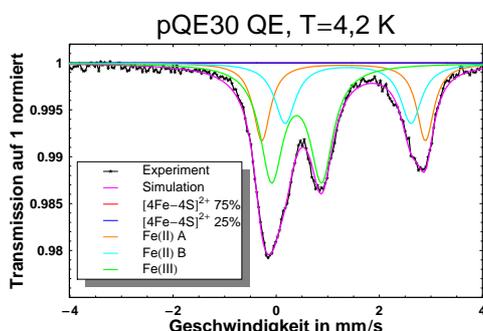
Abbildung 4.5: Mössbauerspektren des rekonstituierten Proteins LytB



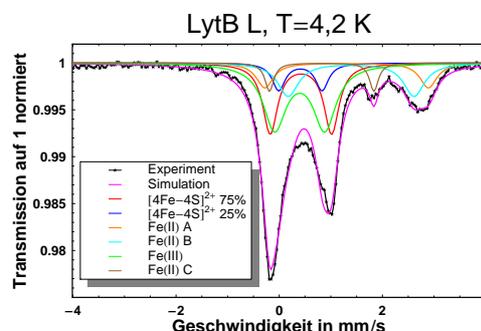
(a) Mössbauerspektrum der Probe pQE30 QE



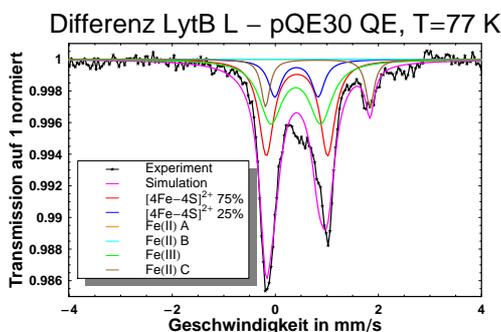
(b) Mössbauerspektrum der Probe LytB L



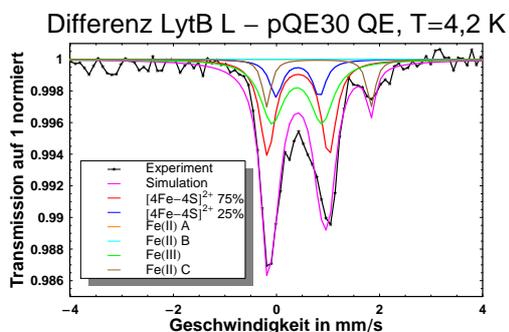
(c) Mössbauerspektrum der Probe pQE30 QE



(d) Mössbauerspektrum der Probe LytB L



(e) Differenz der Mössbauerspektren bei T=77 K



(f) Differenz der Mössbauerspektren bei T=4,2 K

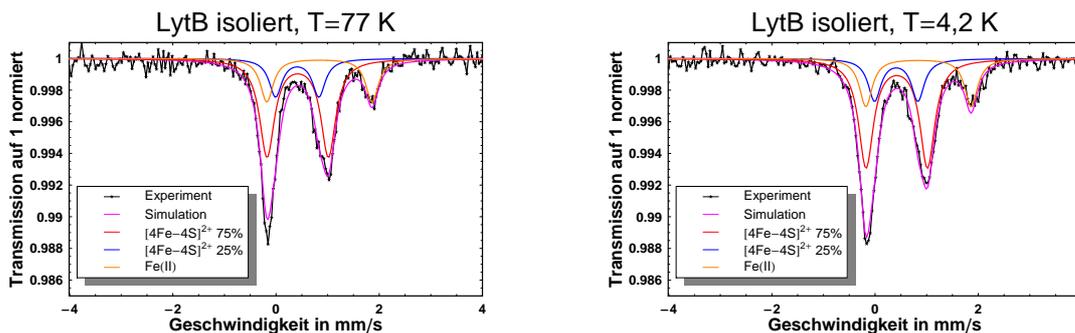
Abbildung 4.6: Mössbauerspektren der ganzen Zellen mit überexprimiertem Protein LytB

Die beiden Graphen (e) und (f) geben die Differenzen der beiden Spektren bei verschiedenen Temperaturen wieder.

### 4.3.2 Das Protein LytB in vivo

Bei den *in vivo* Proben wurde das Protein in *E. coli* überexprimiert. Zur Referenz wurde der gleiche Stamm ohne eine Überexprimierung hergestellt (pQE30 QE). Die Mössbauerspektren sind in Abbildung 4.6 dargestellt. In den Spektren der Referenzprobe pQE30 QE können zwei  $\text{Fe}^{2+}$  Komponenten mit den Parametern  $\delta = 1,31 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 3,17 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,40 \text{ mms}^{-1}$  sowie  $\delta = 1,39 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 2,44 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,49 \text{ mms}^{-1}$  ausgemacht werden. Zusätzlich ist eine  $\text{Fe}^{3+}$ -Komponente in der Probe enthalten:  $\delta = 0,40 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,97 \text{ mms}^{-1}$  und mit  $\Gamma = 0,54 \text{ mms}^{-1}$ . In den Zellen der Probe LytB L ist zu den drei Komponenten der Referenz der Eisen-Schwefel-Cluster mit den gleichen Parametern identifizierbar, wie sie bereits im rekonstituierten Protein bekannt sind. Zusätzlich tritt ein weiteres Dublett mit den Parametern  $\delta = 0,82 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 2,03 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma = 0,3 \text{ mms}^{-1}$  auf und wird einem weiteren  $\text{Fe}^{2+}$  zugeordnet.

### 4.3.3 Das isolierte Protein LytB



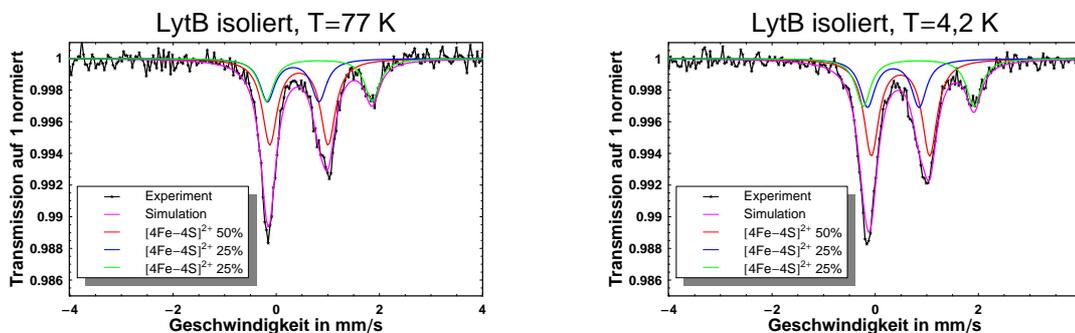
(a) Mössbauerspektrum der Probe LytB isoliert (b) Mössbauerspektrum der Probe LytB isoliert

Abbildung 4.7: Mössbauerspektren des isolierten Proteins LytB. Die Komponenten treten in diesem Fit im Verhältnis 3:1 auf und einer zusätzlichen Komponente.

In der Isolierung des Proteins LytB aus den Zellen des vorangegangenen Unterkapitels können zwei der drei  $\text{Fe}^{2+}$  Komponenten und das komplette  $\text{Fe}^{3+}$  entfernt werden. Die Mössbauerspektren des Proteins sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Spektren des isolierten LytB lassen sich mit den Parametern aus den vorherigen Fits anpassen. Dabei hat der Clusters einen Flächenanteil von 77,6 % und der  $\text{Fe}^{2+}$  einen Anteil von 22,4 %.

Wird der Fit mit einem festen Flächenverhältnis von 2:1:1 ausgeführt und die  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente als Teil des Clusters interpretiert, so ergeben sich für die Komponenten die Parameter: für die 50 % Komponente  $\delta = 0,44 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,13 \text{ mms}^{-1}$  und

$\Gamma=0,35 \text{ mms}^{-1}$ , für die erste 25 % Komponente  $\delta = 0,83 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=2,04 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,35 \text{ mms}^{-1}$  und für die zweite 25 % Komponente  $\delta = 0,33 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,00 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,35 \text{ mms}^{-1}$ . Dieser Fit ist in Abbildung 4.8 dargestellt.



(a) Mössbauerspektrum der Probe LytB isoliert (b) Mössbauerspektrum der Probe LytB isoliert

Abbildung 4.8: Mössbauerspektren des isolierten Proteins LytB. Die Komponenten treten in diesem Fit im Verhältnis 2:1:1 auf.

## 4.4 Zusammenfassung

### GcpE

Die durchgeführten Untersuchungen des GcpE-Proteins zeigen, dass es einen  $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ -Cluster enthält. Die Mössbauerspektren des GcpE oberhalb von 77 K zeigen eine Komponente, welche typische Parameter für solche Cluster zeigt [13]. Im Temperaturbereich des flüssigen Heliums, bleibt die Struktur im schwachem Magnetfeld ( $B=20 \text{ mT}$ ) erhalten und geht bei höheren Magnetfeldern ( $B=7 \text{ T}$  senkrecht) in ein diamagnetisches Spektrum über. Die Asymmetrie des Mössbauerspektrums lässt den Schluss zu, dass der Cluster zwei verschiedene Parametersätze zeigt. Die Anpassung des Fits gelang durch die Verwendung von zwei Komponenten im Verhältnis 3:1. Dieses Verhältnis ließe sich durch einen Nicht-Cystein-Liganden erklären. Die Zugabe von Substrat zu dem Protein verändert das Spektrum nicht und lässt vermuten, dass das Protein nicht über längere Zeiten an das Substrat bindet.

Der Vergleich der Mössbauerspektren des GcpE-Proteins *in vivo* mit Stämmen, welche GcpE überexprimieren, und solchen, welche es nicht exprimieren, bestätigen die Ergebnisse des ersten Probenserie. Das Protein kann daher als stabil unter der Aufreinigungsprozedur angesehen werden.

Das aus den ganzen Zellen gewonnene isolierte GcpE lässt sich mit den Parametern der vorhergehenden Experimenten anpassen. Auffällig ist die veränderte  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente. Diese zeigt sich verändert gegenüber den Proben mit dem rekonstituierten Protein.

**LytB**

Die Analyse des Proteins LytB folgt dem gleichem Schema, wie die Untersuchungen des GcpE-Proteins. In den Proben mit dem rekonstituierten Protein, lässt sich ebenfalls ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster identifizieren. Die Mössbauerspektren zeigen ebenfalls diamagnetische Aufspaltung bei tiefen Temperaturen und hohem Feld. Allerdings sind die Spektren durch einen magnetischen Untergrund gekennzeichnet.

In dem Vergleich zwischen überexpmierenden und nicht expmierenden Zellen bestätigen sich die Ergebnisse aus den Messungen mit dem rekonstituierten Protein. Eine völlige Eliminierung des Untergrundes war aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens der Zellen nicht möglich.

Die Mössbauerspektren des aus den ganzen Zellen isolierten LytB-Proteins, zeigt einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster mit einem 3:1 Verhältnis seiner Komponenten, sowie einer deutlichen  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente, deren relativer Anteil bei circa 20% der Gesamtfläche liegt. Setzt man statt einem 3:1 Verhältnis ein 2:1:1 Verhältnis voraus, und bezieht die  $\text{Fe}^{2+}$ -Komponente in den Cluster ein, so ergeben sich Parameter ähnlich denen von Walters *et al.* [98]. Die Qualität des Fits ändert sich dann nicht.



## 5 Das Z-Protein des Lassa Virus

Das Lassa Virus ist ein behülltes, zweisegmentiges, einsträngiges RNA Virus der Familie der Arenaviridae und gehört zur Gattung der Arenaviren. Es ist endemisch in West-Afrika vertreten und verantwortlich für mehrere 100000 Fälle des Lassafiebers, die circa 5000 Todesfälle pro Jahr zur Folge haben [99, 100].

Das Virus kodiert mit jedem RNA-Segment zwei Proteine. Das S-RNA<sup>1</sup> Segment codiert das virale Glycoprotein-Vorstufen-Protein (GPC<sup>2</sup>) und das Nukleoprotein (NP). Das L-RNA<sup>3</sup> Segment kodiert die virale Polymerase (L-Protein) und ein Zink bindendes Protein (Z-Protein). Bei den Z-Proteinen der Arenaviren handelt es sich um zwei Zink-Ionen bindende Proteine mit einer Länge von circa 100 Aminosäuren (Zinkfinger-Protein).

Die Struktur des Proteins konnte bisher nicht kristallographisch aufgenommen werden. Ein Modell bietet das Z-Protein des Pferdeherpesvirus (CHC<sup>4</sup>) [101]. Aus dem Genom des Lassa-Z-Proteins und des vergleichbaren Z-Proteins des Pferdeherpesvirus ergeben sich zwei mögliche Bindungsplätze für Metallionen. Der eine Bindungsplatz wird durch vier Cysteine (Platz A) realisiert und der andere durch drei Cysteine und ein Histidin (Platz B). Im Modell des Z-Proteins des Pferdeherpesvirus ergibt sich für den Abstand zwischen den beiden Zentren eine Distanz von circa  $r_{AB}=14,2 \text{ \AA}$ .

Aus Vorversuchen [102] ist bekannt, dass das Zink im Z-Protein des Lassa Virus sich auch durch andere Metalle ersetzen lässt. Vor allem ist das Lassa Virus Z-Protein in der Lage, sowohl Zink als auch Eisen zu binden. Von besonderem Interesse ist die Affinität zu Eisen, welches in den Wirten dieser Viren in hohem Maße verfügbar ist. Die Mössbauerspektroskopie kann hier selektiv die Zentren beobachten und einen Einblick in die Besetzung des Proteins mit Eisenionen geben. Ebenso kann die Mössbauerspektroskopie die Zentren aufgrund ihrer verschiedenen Liganden unterscheiden.

Bei den Experimenten mit Z-Proteinen, welche sowohl Eisen als auch Zink enthalten, stand die Frage nach der teilweisen Besetzung mit Eisenionen im Vordergrund. Eine eventuell gemischte Besetzung mit Eisen- und Zinkionen würde das Mössbauerspektrum entsprechend verändern. Die Voruntersuchungen lieferten auch Hinweise auf eine teilweise Zerstörung bzw. irreversible Prozesse bei der Reduktion des Z-

---

<sup>1</sup>S-RNA: short RNA (kurzes RNA Segment)

<sup>2</sup>GPC: glycoprotein precursor protein

<sup>3</sup>L-RNA: large RNA (langes RNA Segment)

<sup>4</sup>Der Name CHC leitet sich aus der Bezeichnung C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> ab, welche abkürzend für die Zink bindenden Aminosäuren steht (3 Cysteine, 1 Histidin und 4 Cysteine).

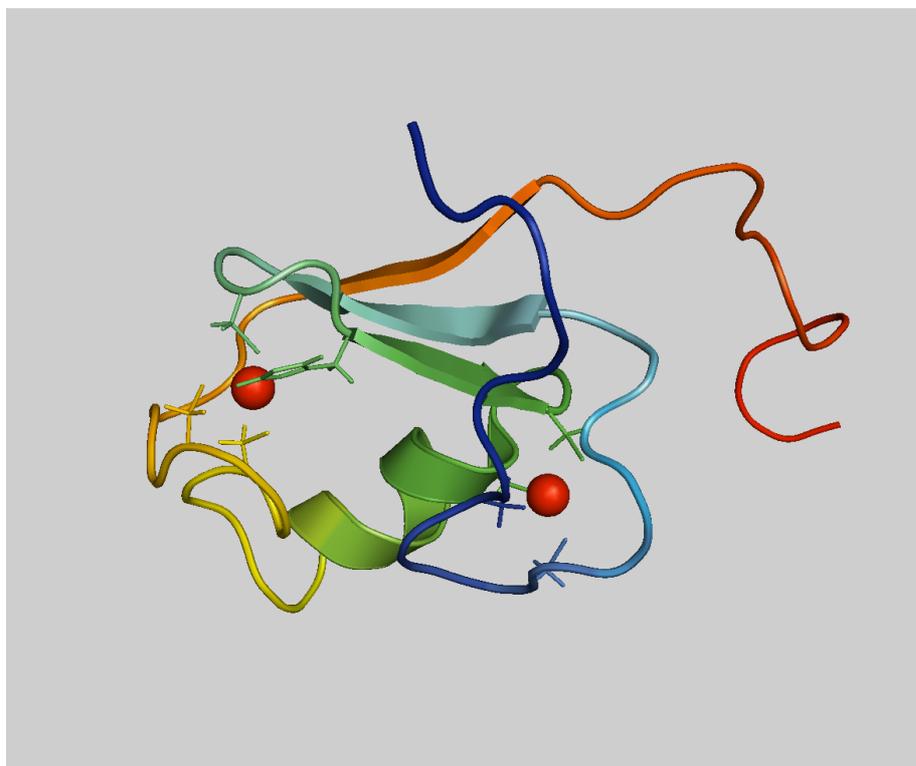


Abbildung 5.1: Struktur des Lassa Z-Proteins des Pferdeherpesvirus  
Die beiden Zink-Zentren sind als rote Kugeln dargestellt. Die bindenden Liganden sind als Stabmodelle hervorgehoben.

Proteins. Zur Klärung der Frage, welche Zentren bei der Reduktion welche Transformation erfahren, folgten Untersuchungen des oxidierten und des reduzierten Z-Proteins mittels der Mössbauerspektroskopie.

Um die spektroskopischen Ergebnisse einordnen zu können, wurden Rechnungen mit der Dichte-Funktional-Theorie durchgeführt. Als Modell diente hierbei die bekannte Struktur des Z-Proteins des Pferdeherpesvirus (Abbildung 5.1), weil die Struktur des Lassa Z-Proteins nicht zur Verfügung stand. Die Wahl des DFT-Programms fiel auf das ORCA-Paket, weil dieses sowohl über die indirekte Berechnung der Isomerieverschiebung mittels einer Eichung verfügt, als auch den Mechanismus der Broken-Symmetry-Berechnung implementiert hat. Um die Anwendbarkeit des ORCA-Pakets auf Eisen-Schwefel-Proteine zu gewährleisten, wurden parallel die Rubredoxine der Organismen *C. pasteurianum* und *P. abyssi* vorgenommen. Für beide sind Daten für Mössbauerspektren in der Literatur verfügbar.

Die Proben stammen aus dem Biochemischen Institut der Universität zu Lübeck, welches mit Hilfe von gentechnisch veränderten *E. coli* Bakterien sechs Proben her-

Tabelle 5.1: Verwendete Proben des Lassa Virus Z-Proteins.

	Name	Beschreibung
I	Lassa Z ox.	Z-Protein im oxidiertem Zustand
II	Lassa Z ox. B	Probe I, erneut aufgereinigt
III	Lassa Z red.	Z-Protein im reduzierten Zustand
IV	Lassa Z red. B	Probe III, erneut aufgereinigt
V	Lassa Z + Zn ox.	Z-Protein mit $^{57}\text{Fe}$ und Zn im ox. Zustand
VI	Lassa Z + Zn red.	Z-Protein mit $^{57}\text{Fe}$ und Zn im red. Zustand

stellte. Bei vier Proben wurde dem Nährmedium nur  $^{57}\text{FeSO}_4$  zugesetzt, bei zwei weiteren wurde ein Gemisch aus  $^{57}\text{Fe}$ - und Zn-Ionen verwendet [102] (siehe Tabelle 5.1). Die Proben liegen sowohl im oxidierten, als auch im reduzierten Zustand vor.

## 5.1 Mössbauerspektroskopie am Z-Protein

### 5.1.1 Proben ohne Zink

Bei den Fits für die Mössbauerspektren wurde die Flächengleichheit der beiden Zentren angenommen. Dies ist nur in erster Näherung gültig und wird hauptsächlich durch eine unterschiedliche Debye-Temperatur und unterschiedliche Bindungsaffinität des Eisens zu den beiden Zentren verfälscht.

Die oxidierte Probe I (Abbildung 5.2) zeigt bei  $T=85$  K drei Komponenten. Die beiden Dubletts mit den Parametern  $\delta = 0,24 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,55 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,28 \text{ mms}^{-1}$  und  $\delta = 0,32 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,57 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,29 \text{ mms}^{-1}$  werden den beiden Eisenzentren (A und B) zugeordnet. Die Komponente mit den Parametern  $\delta = 0,56 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,75 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,39 \text{ mms}^{-1}$  ist ein unspezifisch gebundenes  $\text{Fe}^{3+}$ . Für das Flächenverhältnis der drei Spezies ergibt sich ein Verhältnis von 4:4:1 (A : B :  $\text{Fe}^{3+}$ ).

Das Spektrum der Probe II zeigt bei  $T=4,2$  K (Abbildung 5.3), dass nach weitergehender Aufreinigung die Absorption um den Faktor 5 abgenommen hat, allerdings auch, dass  $\text{Fe}^{3+}$  vollständig entfernt werden konnte und daher das  $\text{Fe}^{3+}$  nicht Bestandteil des Proteins sein kann. Der Rückgang der Absorption kann auf die Tatsache zurückgeführt werden, dass ein Teil der Proteine beim Aufreinigungsprozess verloren gegangen sind.

Für die Messungen in einem Magnetfeld von  $B=7$  T wurde die Probe I aufgrund ihrer größeren Absorption verwendet, obwohl diese noch den  $\text{Fe}^{3+}$  Anteil enthält. Das Spektrum ist in Abbildung 5.4 dargestellt und zeigt einen paramagnetischen Untergrund der dem  $\text{Fe}^{3+}$  zugeordnet wird. Die Region um  $0 \text{ mms}^{-1}$  zeigt hingegen

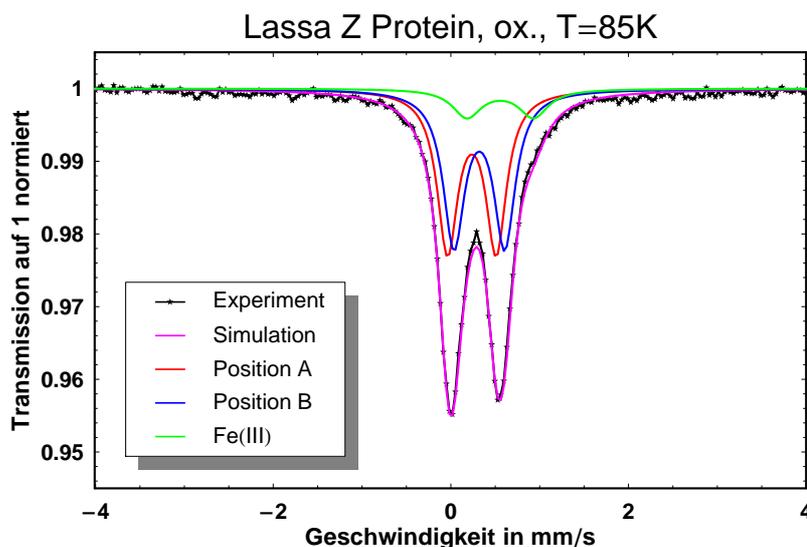


Abbildung 5.2: Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins  
Die experimentellen Daten (schwarzen Sterne) sind mit einer schwarzen Führungslinie verbunden.

ein deutlicher ausgeprägtes diamagnetisches Spektrum, das auf die Existenz einer Komponente mit gradzahligem Spin hindeutet. Der Fit des diamagnetischen Anteils wurde mittels zwei Spin-Hamiltonians mit den Parametern aus der Messung bei  $T=85\text{ K}$  und  $\eta=1$  mit gleicher Fläche durchgeführt. Ein Spektrum eines Rubredoxin-Zentrums (wie es beispielsweise in [103] gezeigt wird), kann nicht beobachtet werden. Die Existenz des diamagnetischen Spektrums deutet auf die Kopplung von zwei Zentren hin, denn die Eisenionen sollten aufgrund der Proteinstruktur und des Mediums als  $\text{Fe}^{3+}$  high-spin vorliegen. Auf Grundlage des Pferdeherpesmodellsystems, in dem die beiden Zentren  $14,2\text{ \AA}$  entfernt voneinander sind, wurden zwei ungekoppelte leicht unterschiedliche rubredoxinartige Spektren erwartet.

Nach der Reduktion der Proben ergibt sich ein Spektrum, wie es in Abbildung 5.5 dargestellt ist. Der Anteil der beiden oxidierten Zentren hat stark abgenommen und auch das  $\text{Fe}^{3+}$  ist vollständig verschwunden. Stattdessen kann eine Komponente mit  $\delta = 0,64\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 3,11\text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,46\text{ mms}^{-1}$  beobachtet werden, welche einem reduzierten Zentrum zugeordnet wird. Dieses reduzierte Zentrum wurde nur mit einem Dublett angepasst. Aus den Experimenten zur erneuten Oxidation der Probe ist bekannt, dass der Reduktionsprozess irreversibel ist und sich das Protein unter der Reduktion zusätzlich verändert hat. Es wird daher vermutet, dass eines der beiden Zentren ausgefallen ist und nur noch ein Zentrum besetzt ist. Eine Unterscheidung, um welches Zentrum es sich handelt, kann nicht getroffen werden, da die Mössbauerparameter nicht eindeutig genug sind, um eines der Zentren zu identi-

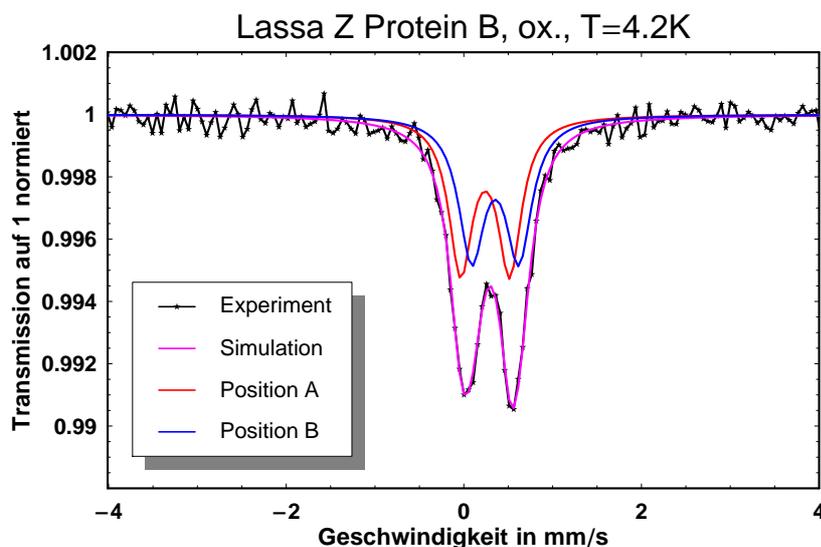


Abbildung 5.3: Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins  
 Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder und sind mit einer schwarzen Führungslinie verbunden. (A:  $\delta = 0,24 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,55 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,32 \text{ mms}^{-1}$ ; B:  $\delta = 0,35 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 0,55 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,35 \text{ mms}^{-1}$ ).

fizieren. Der Fit für das reduzierte Spektrum lässt sich sowohl für eine als auch für zwei vorhandene reduzierte Zentren durchführen.

Desweiteren wird eine Komponente mit  $\delta = 1,16 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = 1,44 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Gamma = 0,65 \text{ mms}^{-1}$  gefunden, welche auf eine  $\text{Fe}^{2+}$ -high-spin Komponente hindeutet. In dem Fit wurden für die Parameter der oxidierten Zentren jene aus dem Fit der Probe I verwendet. Die beiden oxidierten Zentren haben zusammen einen Flächenanteil von 22,6 %, das reduzierte Zentrum einen von 10,9 % und die restlichen 66,5 % sind die  $\text{Fe}^{2+}$  Komponente. Die  $\text{Fe}^{2+}$  Komponente hat in dem Spektrum einen deutlich höheren Anteil als die  $\text{Fe}^{3+}$  Komponente in der oxidierten Probe. Da die relativen Flächenanteile gleich bleiben müssen, kann sich nur ein Zentrum in  $\text{Fe}^{2+}$  umgewandelt haben. Dies stützt die Vermutung, dass eines der beiden Zentren unter der Reduktion zerstört wird und sich das Eisen aus dem betroffenen Bindungsplatz gelöst hat.

Das Spektrum der reduzierten Probe bei  $T=4,2\text{K}$  ist in Abbildung B.2 dargestellt. Für alle Komponenten ergibt sich ein Spektrum im Bereich um  $1 \text{ mms}^{-1}$ , daher ist ein Fit auf dieses Spektrum nur gering aussagekräftig. Das Spektrum bestätigt, dass in der Probe keine signifikanten paramagnetischen Spezies vorhanden sind.

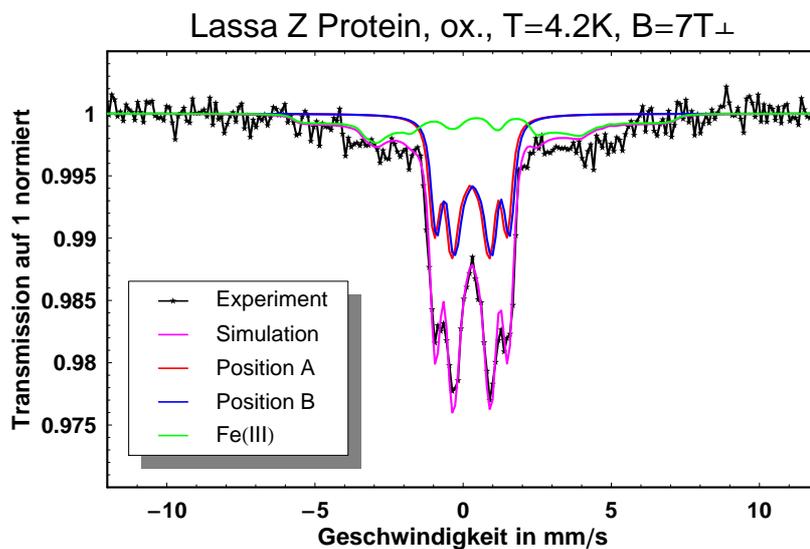


Abbildung 5.4: Spektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins bei T=4,2 K

Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder. Die Summation ist in magenta dargestellt, die beiden oxidierten Positionen in rot und blau, die reduzierte Position in orange und das unspezifische Fe<sup>2+</sup> in cyan.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Mössbauer Messungen am Z-Protein des Lassa Virus. Die A- und B-Zentren werden sowohl im oxidierten, wie auch im reduzierten Protein gefunden.

Zentrum	$\delta$ in $\text{mms}^{-1}$	$\Delta E_Q$ in $\text{mms}^{-1}$
Z-Protein A	0,24	0,55
Z-Protein B	0,32	0,57
Z-Protein red.	0,64	3,11
Z-Protein + Zn A	0,24	0,55
Z-Protein + Zn B	0,32	0,57
Z-Protein + Zn red.	0,64	3,11

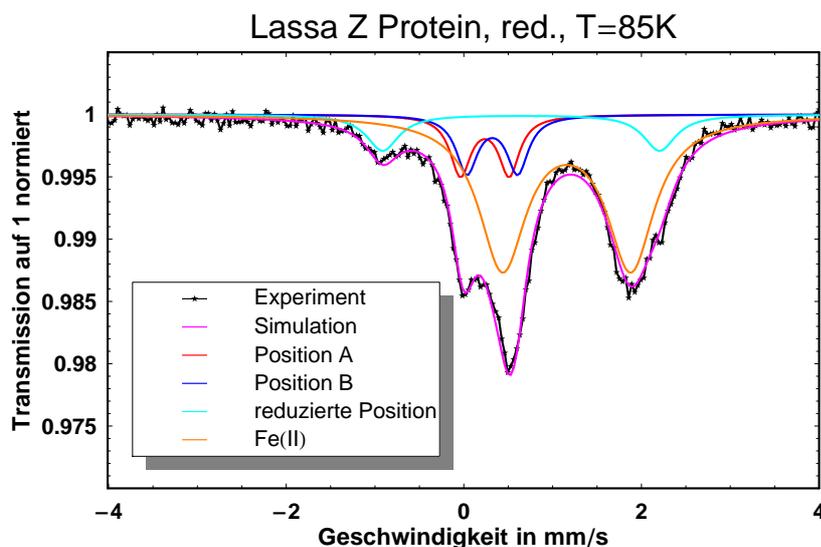


Abbildung 5.5: Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins bei T=85 K

Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder und sind mit einer schwarzen Führungslinie verbunden.

### 5.1.2 Gemischte Eisen-Zink-Proben

Für die Spektrenanpassung der zusätzlich mit Zink angereicherten Proben wurden für alle Fits die Parameter der Zentren aus den vorangegangenen Probenfits verwendet.

Das Spektrum der Probe V (Abbildung 5.6) zeigt ein ähnliches Aussehen wie die Proben I und II. Der Anteil an  $\text{Fe}^{3+}$  steigt in dieser Probe auf 43,5 % und ergibt dann mit den beiden Zentren ein Verhältnis von 1:1:1,5 (A : B :  $\text{Fe}^{3+}$ ).

Auch die reduzierte Probe (Abbildung 5.7) lässt sich mit Hilfe der aus den vorangegangenen Proben gewonnenen Parametern anpassen. Der Anteil des reduzierten Zentrums sinkt auf 2,1 % der Gesamtfläche, wobei hingegen der Anteil der beiden oxidierten Zentren auf zusammen 30,3 % steigt und das  $\text{Fe}^{2+}$  unverändert bleibt.

Die Spektren bei einem hohen magnetischen Feld sind in den Abbildungen B.3 und B.4 wiedergegeben. Eine Analyse wurde aufgrund der schlechten Statistik nicht vorgenommen. Die Spektren sind aber konsistent mit den Ergebnissen der Mössbauerspektren aus den Proben mit reinem Eisen.

Die Mössbauerspektren der mit Zink- und Eisenionen versetzten Proteine lassen sich durchweg mit den Parametern der Proben ohne Zink anpassen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass bei der Anwesenheit von Zink das Eisen vollständig aus dem Protein verdrängt wird und keine Mischbesetzung der Bindungsplätze mit je

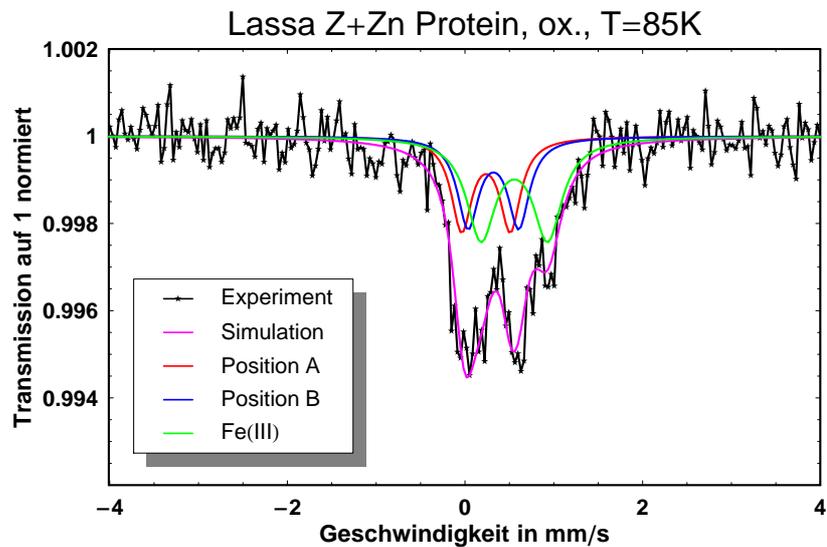


Abbildung 5.6: Mössbauerspektrum des mit Zn versetzten oxidierten Lassa Z-Proteins bei T=85 K  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder.

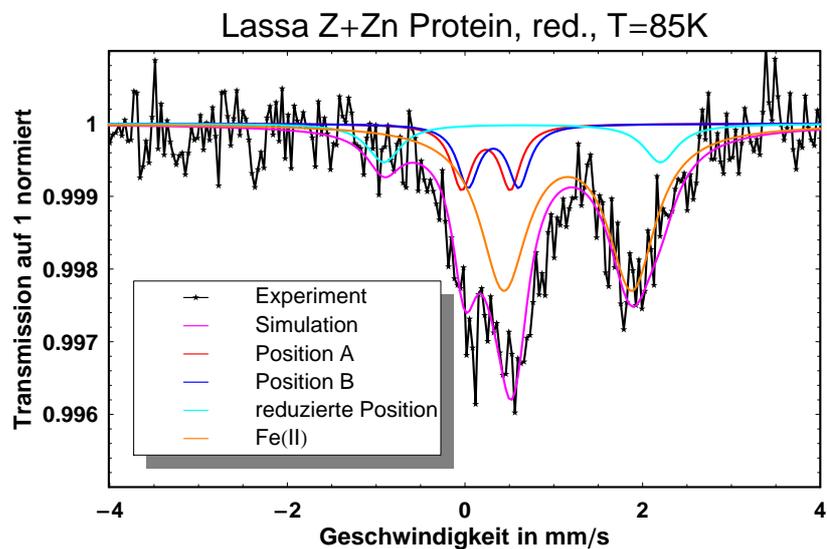


Abbildung 5.7: Mössbauerspektrum des mit Zn versetzten reduzierten Lassa Z-Proteins  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder.

einem Eisen- und einem Zinkionen auftreten.

## 5.2 Rechnungen mit der Dichte-Funktional-Theorie (DFT) an rubredoxinartigen Eisenzentren

### 5.2.1 DFT am Z-Protein des Pferdeherpes-Virus

Zum Vergleich mit den Ergebnissen aus der Mössbauerspektroskopie wurden an dem Modellsystem des Pferdeherpes-Virus Dichte-Funktional-Theorie-Rechnungen (DFT-Rechnungen<sup>5</sup>) durchgeführt. Dazu wurde die Kristallstruktur aus der PDB Datenbank<sup>6</sup> verwendet, welche von Barlow *et al.* [101] untersucht wurde. Hierbei interessiert vor allem die Frage, ob sich eine Kopplung, wie sie in den Hochfeld-Spektren der Proben beobachtet wurde, erklären lässt.

Um den Rechenaufwand zu begrenzen, wurden aus der Kristallstruktur die beiden Zink-Zentren mit ihren Liganden bis in eine Tiefe von drei Atomen extrahiert und die offenen Bindungen mit Wasserstoffatomen abgesättigt. Die Zinkatome wurden durch Eisenatome ersetzt. Eine Geometrie Optimierung der hinzugefügten Wasserstoffatome erfolgte mit dem Gaussian 03 Programm [28], ohne die Position der anderen Atome zu verändern. Die zur Berechnung benutzten Atome sind in Abbildung 5.2.1 dargestellt.

Die DFT-Rechnung wurde mit dem Programmpaket ORCA von F. Neese [6, 9] ausgeführt. Als Funktional kam dabei B3LYP/G<sup>7</sup> [106, 107, 108, 109, 110] mit den beiden Basissätzen SV(P) [111] und TZV(P) [112] zum Einsatz. Die Eisenatome wurden durch die von Neese *et al.* entwickelte Basis CP(PPP) [6, 111, 112, 113, 114] beschrieben. Das ORCA-Paket enthält einen Mechanismus zur direkten Berechnung der Broken Symmetry Austauschwechselwirkung und des Kopplungsparameters  $J$ . Zur Kalibrierung der Elektronendichte am Kernort  $\rho(0)$  wurden die von F. Neese [6] gefundenen Parameter für das Funktional B3LYP verwendet

$$\delta_{B3LYP} = 6,54806 - 0,36662(\rho(0) - 11800) \text{ in mms}^{-1} \quad (5.1)$$

und daraus die Isomerieverschiebung  $\delta$  berechnet. Die Zentren wurden zunächst isoliert voneinander berechnet. Zum Ausgleich der Ladung des zweiten Zentrums wurde am Ort des nicht betrachteten Zentrums eine Punktladung ohne Wellenfunktion eingefügt. In einer weiteren Betrachtung wurden beide Zentren zeitgleich berechnet und der Austauschparameter  $J$  bestimmt.

Die Tabelle 5.3 fasst die aus den Rechnungen gewonnenen Mössbauerparameter zusammen. Das Zentrum A (vier Schwefelliganden) weist hierbei eine um  $\Delta\delta$

---

<sup>5</sup>Für eine Einführung in die DFT Rechnungen sei beispielsweise auf die Bücher von Jensen [104], sowie Koch und Holthausen [105] verwiesen.

<sup>6</sup>PDB Datenbank: [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), Struktur ID: 1CHC

<sup>7</sup>Bei B3LYP/G handelt es sich um das Funktional B3LYP aus dem Gaussian Programm Paket.

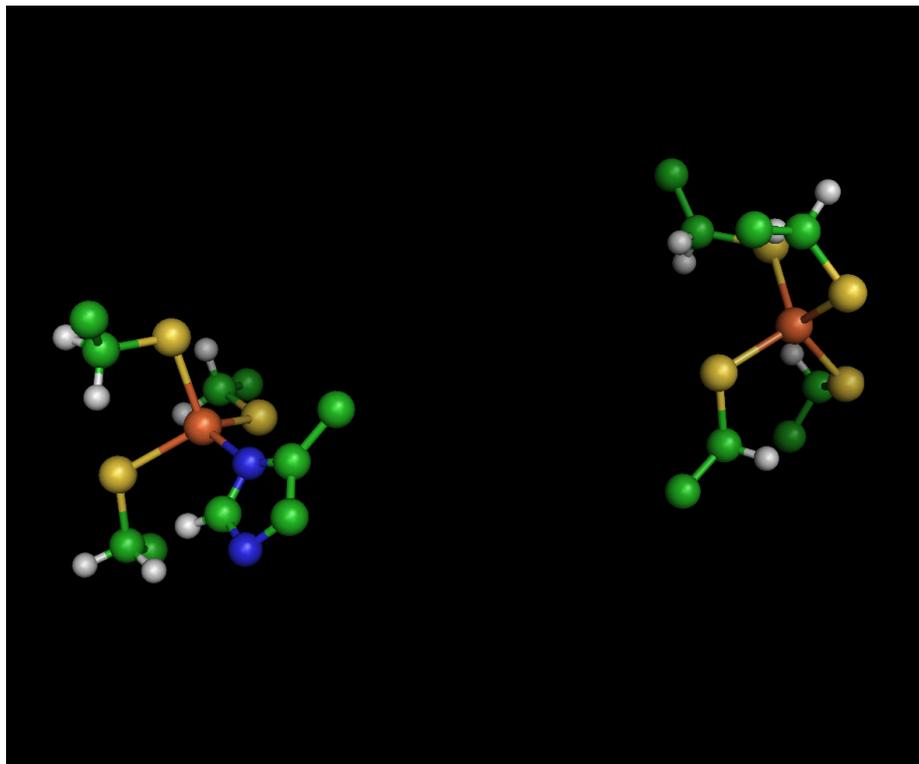


Abbildung 5.8: Zentren des Pferdeherpes-Virus

Die Farben symbolisieren die verschiedenen Atome: Weiß = Wasserstoff, Türkis = Kohlenstoff, Blau = Stickstoff, Gelb = Schwefel, Orange = Eisen. Das Zentrum mit den vier Schwefelliganden ist der Bindungsplatz A (rechts), das Zentrum mit den drei Schwefel- und dem Stickstoffliganden ist das Zentrum B (links).

Tabelle 5.3: Ergebnisse der DFT-Rechnungen an dem Pferdeherpes-Virus. AB bezeichnet die gemeinsame Berechnung, A das Zentrum A, B das Zentrum B. Der angehängte Buchstabe Q symbolisiert, dass in der Rechnung eine virtuelle Ladung am Ort des jeweils anderen Zentrums verwendet wurde.

Name	Dichte in a.u. <sup>-3</sup>	$\delta$ in mms <sup>-1</sup>	$\Delta E_Q$ in mms <sup>-1</sup>	$\eta$	Basis
AB - A	11816,82	0,380	0,929	0,431	SV(P)
AB - B	11816,73	0,416	-0,771	0,306	SV(P)
A	11816,81	0,384	0,872	0,357	SV(P)
B	11816,72	0,418	-0,770	0,264	SV(P)
AQ	11816,82	0,380	0,925	0,430	SV(P)
BQ	11816,73	0,416	-0,771	0,306	SV(P)
A	11816,85	0,371	0,896	0,423	TZV(P)
B	11816,75	0,406	-0,762	0,311	TZV(P)
AQ	11816,85	0,371	0,909	0,445	TZV(P)
BQ	11816,75	0,406	-0,763	0,309	TZV(P)

= 0,036 mms<sup>-1</sup> niedrigere Isomerieverschiebung auf, als das Zentrum B mit drei Schwefel- und einem Stickstoffliganden. In den Mössbauerspektren konnte ein Unterschied von  $\Delta\delta = 0,084 \pm 0,01$  mms<sup>-1</sup> zwischen den beiden Zentren beobachtet werden. Der absolute Fehler der Kalibrierung, zur Berechnung der Isomerieverschiebung  $\delta$  aus der Elektronendichte am Kernort  $\rho(0)$ , ist  $\Delta\delta=0,086$  mms<sup>-1</sup> [6]. Damit liegen die berechneten Isomerieverschiebungen nur durch das halbe Fehlerintervall getrennt voneinander.

Die errechneten absoluten Isomerieverschiebungen überschätzen die tatsächlichen beobachteten um circa zwei Fehlerintervalle. Dies ist nicht untypisch für Berechnungen der Elektronendichte am Kernort, denn das Programm errechnet die Elektronendichte für eine Temperatur T=0 K und betrachtet die verwendeten Moleküle als lägen sie in der Gasphase vor. Damit wird die Veränderung der Isomerieverschiebung durch die Temperatur<sup>8</sup> nur bedingt wiedergegeben.

Der Austauschparameter  $J$  wurde in der Rechnung mit einem Wert von praktisch 0 cm<sup>-1</sup> bestimmt. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen für zwei Zentren mit einem Abstand von 14,2 Å. Die Mössbauerspektren in hohen Magnetfeldern zeigen allerdings deutlich, dass eine starke Kopplung vorhanden ist. Eine mögliche Erklärung könnte die kürzere Aminosäuresequenz des Lassa Z Virus gegenüber dem Pferdeherpesvirus sein, wodurch die beiden Zentren näher beieinander liegen könnten. Eine Proteinfaltung anhand der Sequenz ist bisher allerdings nicht gelungen. Ebenso ist es bekannt, dass das Protein dazu neigt, in der Gegenwart von Metallionen Clus-

<sup>8</sup>second order Doppler shift

ter aus circa 12-14 Monomeren zu bilden, welche Ähnlichkeiten mit einer Virushülle zeigen [100, 115]. Die Metallzentren liegen dabei nahe der Oberfläche, so dass eine Wechselwirkung mit benachbarten Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann.

Eine weitere Erklärung könnte sein, dass drei der vier Schwefel des A Bindungsplatzes an der Oberfläche des Proteins liegen (Abbildung 5.9). Aus PIXE<sup>9</sup> und AAS<sup>10</sup> Messungen ist bekannt, dass dieses Protein eher drei Zinkatome bindet anstatt zwei. Dies könnte bedeuten, dass diese drei Schwefel einen weiteren Bindungsplatz ( $A_2$ ) für ein Metallion bereitstellen. Nimmt man eine Bindung der beiden Eisenatome an diese Plätze A und  $A_2$  an, so würde dies auch eine Erklärung für die starke Kopplung in den Hochfeldspektren liefern. Das Modell mit den beiden gebundenen Eisen und einer weiteren OH-Gruppe ist in Abbildung 5.10 dargestellt. Für das mit Eisen substituierte Protein liefern die PIXE Messungen allerdings nur eine Besetzung von einem Atom pro Monomer, so dass das Zentrum B in diesem Fall eher als unbesetzt gelten muss. Aus Studien von C. Schmidt [116] ist bekannt, dass Eisenionen eine sehr schlechte bis keine Affinität zu Zentren mit Histidinliganden besitzen. Demnach müsste das Eisen nur das Zentrum A, sowie das hypothetische Zentrum  $A_2$  besetzen. Ein solches Zentrum könnte auch den Effekt der nicht erneuten Oxidierbarkeit erklären. Unter der Reduktion wird das außen liegende Metallion reduziert, geht in  $Fe^{2+}$  über und wird vom Protein abgelöst. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass der Anteil an  $Fe^{2+}$  in den reduzierten Proben zunimmt.

Diese Art der Besetzung könnte auch die Ähnlichkeit der Eisen-Spektren zu den Eisen-Zink-Spektren erklären. Wenn die Eisenionen nur das A-Zentrum besetzen und keine Kopplung zwischen den Zentren A und B existiert, so würde eine Besetzung des B-Zentrums mit einem Zink keine Änderung am Mössbauerspektrum verursachen. Sobald aber das Eisen aus dem A- und  $A_2$ -Bindungsplatz verdrängt wird, ist das Molekül für die Mössbauerspektroskopie nicht mehr sichtbar.

Für eine DFT Rechnung des in Abbildung 5.10 dargestellten Moleküls ergeben sich für die Mössbauer Parameter folgende Werte: Bindungsplatz  $A_2$ :  $\delta = 0,498 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = -2,494 \text{ mms}^{-1}$  und  $\eta = 0,238$ ; Bindungsplatz A:  $\delta = 0,485 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q = -2,732 \text{ mms}^{-1}$  und  $\eta = 0,702$ . Das Modell wurde mit dem Basissatz SV(P) berechnet. Die Betrachtung mittels des Broken Symmetry Formalismus ergibt einen Energieunterschied von  $\Delta E_{BS} = 0,1971 \text{ eV}$ . Der Kopplungsparameter ergibt sich zu  $J = -63,02 \text{ cm}^{-1}$  und spricht in diesem Fall für eine antiferromagnetische Kopplung der beiden Spins.

### 5.2.2 DFT Rechnungen an den Rubredoxinen aus

---

<sup>9</sup>proton induced X-ray emission spectroscopy

<sup>10</sup>atomic absorption spectroscopy

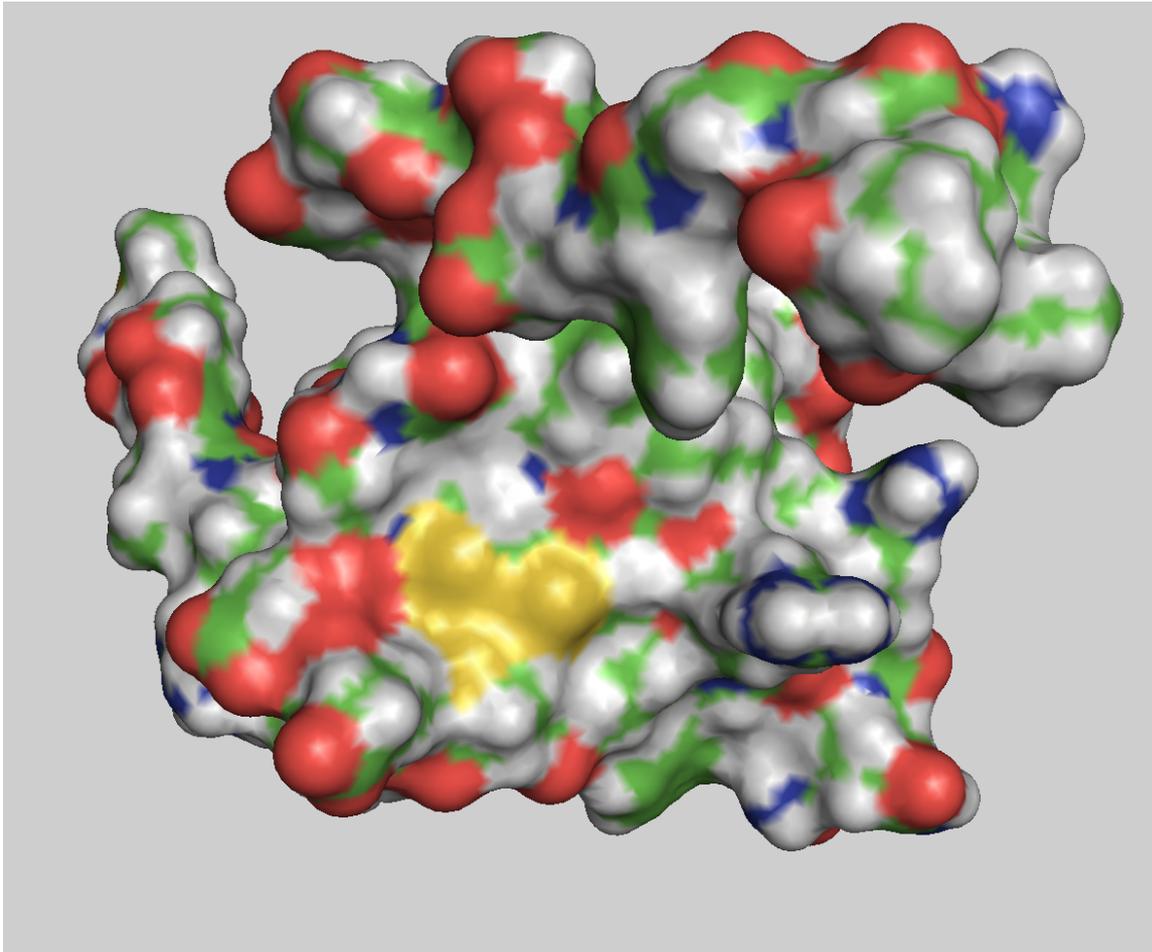


Abbildung 5.9: Oberfläche des Pferdeherpes-Virus Z-Proteins  
Die drei gelb dargestellten Atomhüllen entsprechen drei der vier  
Schwefelliganden des Zentrums A.

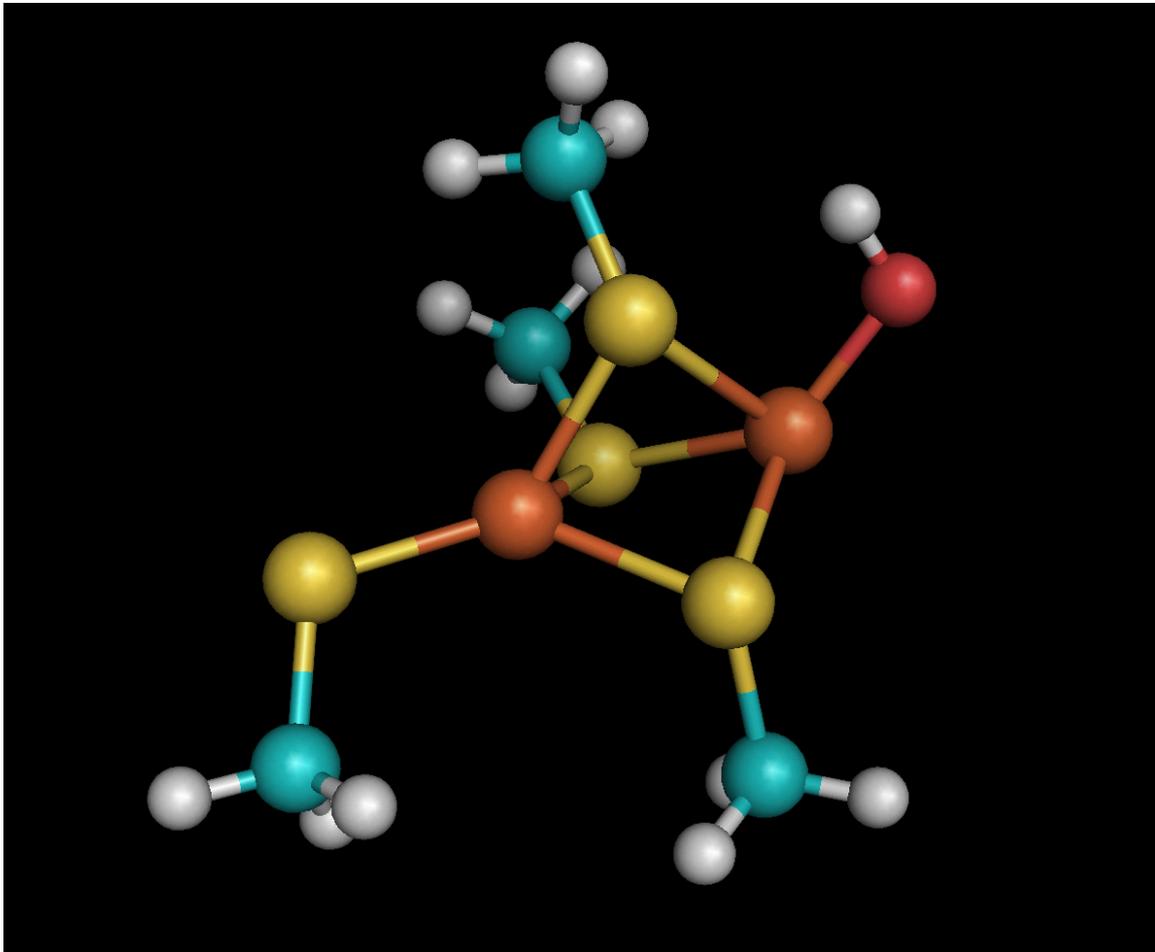


Abbildung 5.10: Modell des dritten Bindungsplatzes am Z-Protein des Lassa Virus  
Die Farben symbolisieren die verschiedenen Atome: Weiß = Wasserstoff, Türkis = Kohlenstoff, Rot = Sauerstoff, Gelb = Schwefel, Orange = Eisen. Die vier Schwefel mit den Methylresten entsprechen den Cysteinen des Proteins und binden das linke Eisen im Bindungsplatz A. Das rechte Eisen ist mit den drei oberflächigen Cyteinen verbunden und besitzt als vierten Liganden eine OH-Gruppe (Bindungsplatz A<sub>2</sub>).

Tabelle 5.4: Ergebnisse der DFT-Rechnungen an den Bakterien *C. pasteurianum* und *P. abyssi*. Die Isomeriewerschiebung und die Quadrupolaufspaltung sind in  $\text{mms}^{-1}$  angegeben.

Name	Spin	$\delta$	$\Delta E_Q$	$\eta$	Basis
<i>C. past.</i>					
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,377	0,431	0,004	SV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>3</sub> (red.)	2	0,835	-3,302	0,002	SV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,329	0,793	0,942	SV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (red.)	2	0,769	-3,366	0,787	SV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,318	0,789	0,964	TZV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (red.)	2	0,759	-3,311	0,772	TZV(P)
<i>P. abyssi</i>					
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,320	0,842	0,535	SV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,309	0,838	0,549	TZV(P)
Modell 1					
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (ox.)	5/2	0,381	0,310	0,399	TZV(P)
FeS <sub>4</sub> + 4*CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (red.)	2	0,832	-3,352	0,330	TZV(P)

## C. pasteurianum und P. abyssi

Die mössbauerspektroskopisch bekannten Rubredoxine der Bakterien *C. pasteurianum* und *P. abyssi* dienen hier als Vergleich. Ihre Kristallstruktur kann in der PDB Datenbank gefunden werden. Für das Rubredoxin des Baktriums *C. pasteurianum* stehen sowohl das oxidierte<sup>11</sup>, wie auch das reduzierte<sup>12</sup> zur Verfügung. Für das Bakterium *P. abyssi* ist nur die oxidierte<sup>13</sup> Variante des Rubredoxins katalogisiert.

Zur Berechnung wurden die Zentren mit ihren Liganden (drei Atome tief)<sup>14</sup> aus den Kristallstrukturen extrahiert und mit Wasserstoffatomen abgesättigt. Im Programmpaket Gaussian 03 wurden die Positionen der Wasserstoffatome optimiert und anschließend für die so erhaltene Geometrie mit dem ORCA Programm die Wellenfunktion berechnet. Die Rechnungen wurden mit dem Funktional B3LYP und den Basissätzen SV(P) sowie TZV(P) und CP(PPP) für das Eisenatom durchgeführt.

Die Ergebnisse der Rechnungen sind in der Tabelle 5.4 zusammengefasst. In der

<sup>11</sup>Struktur ID: 1FHH

<sup>12</sup>Struktur ID: 1FHM

<sup>13</sup>Struktur ID: 1YK5

<sup>14</sup>Für das Bakterium *C. pasteurianum* wurde die Rechnung auch für eine nur zwei Atome tief gehende Extrahierung berechnet.

Tabelle 5.5: Mössbauerparameter für verschiedene Rubredoxine aus der Literatur. Die Isomerieverschiebung und die Quadrupolaufspaltung sind in  $\text{mms}^{-1}$  angegeben.

Cluster	Spin S	$\delta$	$\Delta E_Q$	Organismus	Referenz
$\text{FeS}_4^{-1}$ (ox.)	5/2	0,37	0,78	<i>C. pasteurianum</i>	[117, 118]
$\text{FeS}_4^{-1}$ (ox.)	5/2	0,32	-0,5	<i>C. pasteurianum</i>	[119]
$\text{FeS}_4^{-1}$ (ox.)	5/2	0,24	(-0,5)	<i>C. pasteurianum</i>	[120]
$\text{FeS}_4^{-2}$ (red.)	2	0,60	3,38	<i>C. pasteurianum</i>	[117]
$\text{FeS}_4^{-2}$ (red.)	2	0,65	3,16	<i>C. pasteurianum</i>	[118]
$\text{FeS}_4^{-2}$ (red.)	2	0,70	-3,25	<i>C. pasteurianum</i>	[119]
$\text{FeS}_4^{-1}$ (ox.)	5/2	0,23	-0,49	<i>P. abyssi</i> Rm 2-13	[103]

Literatur [117, 118, 119, 120, 103] können zu den Rubredoxinen unterschiedliche Angaben gefunden werden (siehe Tabelle 5.5). Die Ergebnisse der Rechnungen zeigen, dass bei steigender Komplexität des untersuchten Modells die errechnete Isomerieverschiebung sinkt, dafür allerdings die Quadrupolaufspaltung steigt. Dies belegt den gravierenden Einfluss des Kohlenstoffatoms in der zweiten Koordinationssphäre. Interessanterweise verändert sich der Parameter  $\eta$  von 0,004 auf 0,942 beim Übergang zum komplexeren Modell. Die Rechnungen mit dem TZV(P) Basissatz ähneln den Rechnungen mit dem SV(P) Basissatz. Die errechneten Isomerieverschiebungen sind bei dem TZV(P) Basissatz tendenziell um  $\sim 3,5\%$  niedriger als bei dem SV(P) Basissatz. Der Vergleich mit den Werten aus der Literatur zeigt, dass die berechneten Parameter übereinstimmen. In der Literatur ist die Isomerieverschiebung für das Bakterium *C. pasteurianum* in dem Bereich 0,24 bis 0,37  $\text{mms}^{-1}$  angegeben. Aus den Rechnungen erhält man Werte im Bereich von 0,318 bis 0,377  $\text{mms}^{-1}$ . Die Quadrupolaufspaltung wird in der Literatur entweder mit  $-0,5 \text{ mms}^{-1}$  oder mit  $0,78 \text{ mms}^{-1}$  angegeben. Errechnet wurden für das komplexe Modell  $0,789 - 0,793 \text{ mms}^{-1}$  bzw.  $0,431 \text{ mms}^{-1}$  im einfachen Modell. Für das komplexe Modell bewegt sich der Parameter  $\eta$  nahe 1, so dass das Vorzeichen der Quadrupolaufspaltung sehr unsicher ist. Im Fall des oxidierten Rubredoxins des Bakteriums *P. abyssi* liegen die Ergebnisse der Rechnungen für die Isomerieverschiebung im Bereich von  $0,309 - 0,320 \text{ mms}^{-1}$ . In der Literatur findet sich der Wert von  $0,23 \text{ mms}^{-1}$ . Die Quadrupolaufspaltung wurde im Bereich von  $0,838 - 0,842 \text{ mms}^{-1}$  berechnet. Bekannt ist ein Wert von  $-0,49 \text{ mms}^{-1}$ . Der errechnete Parameter  $\eta$  ergibt sich zu  $0,535 - 0,549$ .

Das reduzierte Rubredoxin des Bakteriums *C. pasteurianum* wird in der Literatur mit den Werten für die Isomerieverschiebung von  $0,60 - 0,70 \text{ mms}^{-1}$  und einer Quadrupolaufspaltung von  $3,16 - 3,38 \text{ mms}^{-1}$  angegeben. Für einen Wert der Qua-

drupolaufspaltung ist ein negatives Vorzeichen angegeben. Die Rechnungen ergeben für die Isomerieverschiebung  $0,769 - 0,835 \text{ mms}^{-1}$ , sowie für die Quadrupolaufspaltung  $-3,302 - -3,366 \text{ mms}^{-1}$ . Die Isomerieverschiebung wird bei der Berechnung mittels DFT, gegenüber den Literaturwerten, überschätzt. Die Quadrupolaufspaltungen werden in demselben Wertebereich wiedergegeben.

Bei dem Modell 1 handelt es sich um  $\text{FeS}_4(\text{CH}_2\text{-CH}_3)_4$ , für das die Geometrie für alle Atome optimiert wurde und nicht durch die Strukturdaten aus der Kristallographie vorgegeben ist. Die berechnete Isomerieverschiebung für dieses Modell liegt im Bereich der anderen Rechnungen und ist am ehesten mit den Parametern aus der Rechnung mit nur einer Kohlenstoffkoordinationssphäre zu vergleichen. Die Quadrupolaufspaltung des oxidierten Eisens ist circa um den Faktor 2 kleiner als bei den anderen Rechnungen (siehe Tabelle 5.4). Dies lässt den Schluss zu, dass durch die Struktur des Proteins (und damit die Position der Kohlenstoffatome in der zweiten Koordinationssphäre) die beobachtbaren Mössbauerparameter entscheidend beeinflusst werden.

Es soll hier noch einmal herausgestellt werden, dass die Literaturwerte der Mössbauerparameter und die Daten der Kristallstrukturen, welche als Basis der Berechnung dienten, nicht von denselben Arbeitsgruppen gewonnen wurden. Dieser Umstand kann durchaus dazu beitragen, dass sich die Ergebnisse der Berechnungen von den Literaturangaben unterscheiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die DFT-Rechnungen zusammen mit der von Neese [6] gegebenen Eichung des Funktionals B3LYP zur Berechnung von Rubredoxinen geeignet ist. Eine Übertragung der Methodik auf das Pferdeherpesvirus ist demnach zulässig und lässt vernünftige Ergebnisse erwarten.

## 5.3 Schlussfolgerungen

Die Anpassung der Spektren erfolgte unter der Annahme, dass zwei unterschiedliche Zentren mit gleicher Absorption vorhanden sein müssen. Diese Annahme ist durch die Proteinsequenz des Lassa Z-Proteins gerechtfertigt. Demgegenüber ist bekannt, dass Metallzentren mit unterschiedlichen Liganden verschiedene Affinitäten aufweisen [116]. Aus PIXE und AAS Messungen ist bekannt, dass der Eisengehalt mit einem erheblichen Fehlerintervall von 50 % nur ein Eisenatom pro Monomer trägt. Die Spektren des Z-Proteins würden sich auch mit nur einem Dublett mit doppelter Fläche und einer Isomerieverschiebung von circa  $\delta=0,28 \text{ mms}^{-1}$ , welches einen Mittelwert der beiden verwendeten Isomerieverschiebungen darstellt, anpassen lassen. Das Spektrometer besitzt bei der verwendeten Eichung eine Auflösung von circa  $0,034 \text{ mms}^{-1} \text{ Kanal}^{-1}$ . Die Aufspaltung der beiden Komponenten würde also nur zwei bis drei Kanäle betragen und liegt damit unter der Halbwertsbreite der Komponenten. Eine Unterscheidung wäre damit nur in Hochfeldspektren möglich, in denen aber eine diamagnetische Komponente beobachtet wird. Das Auftreten dieser dia-

magnetischen Komponente legt den Schluss nahe, dass in der Probe eine Spezies mit gradzahligem Spin vorhanden sein muss. Für die rubredoxinartigen Zentren ist dieser Spin im oxidierten Zustand nicht zu erwarten. Daher müssen die beiden Zentren mit anderen Spins bzw. untereinander gekoppelt sein.

Die durchgeführten Rechnungen legen nahe, dass eine Kopplung innerhalb des Proteins zwischen den Zentren A und B auszuschließen ist. Das Protein ist allerdings dafür bekannt, dass es sich in der Gegenwart von Metallionen zu Polymeren von circa 12 - 14 Monomeren zusammenlagert und eine kapselförmige Struktur ähnlich einer Virushülle bildet. Aus der Kristallstruktur des Pferdeherpesvirus ist bekannt, dass die Zentren relativ nahe der Proteinoberfläche liegen. Eine Kopplung mit benachbarten Proteinen ist somit nicht ausgeschlossen aber eher unwahrscheinlich, da typische Abstände zwischen den Molekülen nicht im Bereich von einigen Ångström erwartet werden.

Das reduzierte Z-Protein wurde nur mit einem Dublett für das reduzierte Zentrum angepasst. Versuche, das reduzierte Z-Protein wieder in den oxidierten Zustand zu überführen, scheiterten, was eine teilweise Zerstörung der Metallzentren bei der Reduktion impliziert. Diese Zerstörung konnte im gestiegenen Anteil der  $\text{Fe}^{2+}$  Konzentration in der reduzierten Probe, im Vergleich zu dem Anteil der  $\text{Fe}^{3+}$  Konzentration in der oxidierten Probe, nachgewiesen werden.

In der Gegenwart von Zink sinkt der Anteil des gebundenen Eisen stark ab. Das Zink besetzt die Bindungsplätze und verdrängt damit einen Teil des Eisens. Eine weitergehende Veränderung ist nicht zu beobachten. Im Hochfeld ist weiterhin die diamagnetische Komponente zu beobachten.

Aus den DFT-Rechnungen ergeben sich zwei verschiedene Spezies, die sich um nur  $\Delta\delta=0,036 \text{ mms}^{-1}$  unterscheiden. Eine separate Beobachtung im Mössbauerspektrum ist damit nicht gegeben. Eine reduzierte Kristallstruktur ist für das Pferdeherpesvirus nicht bekannt, weshalb eine Berechnung des reduzierten Zustandes nicht möglich war. Die Vorzeichen der Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  und des Parameters  $\eta$  konnten weder für den oxidierten, noch den reduzierten Zustand eindeutig durch die Rechnung bestimmt werden, da das  $\eta$  nahe 1 liegt.

Die Rechnungen zu dem Modellsystem (Abbildung 5.10) mit dem Bindungsplatz  $A_2$  ergeben eine starke Kopplung von  $J = -63,02 \text{ cm}^{-1}$  zwischen den beiden beteiligten Eisenionen. Die berechnete Quadrupolaufspaltung der beiden Zentren liegen allerdings weit entfernt von den experimentell beobachteten Quadrupolaufspaltungen. Die Rechnungen belegen, dass ein solcher Bindungsplatz durchaus möglich ist. Allerdings scheint das Modellsystem nicht ausreichend, um die Beobachtungen zu erklären. Die größte Unsicherheit geht dabei von den zusätzlichen Liganden aus, die für das Modell angenommen werden können. Die durchgeführte Rechnung nutzte nur eine zusätzliche OH-Gruppe am Eisenzentrum  $A_2$ . Ein Modellsystem mit mehr  $\text{OH}^-$  Gruppen könnte hier Erfolg versprechen.

Die Vergleichs-Rubredoxine liefern mit derselben Methode, die zur Berechnung des Pferdeherpesvirus verwendet wurde, Ergebnisse, welche mit den Parametern aus der

Literatur übereinstimmen. Die Quadrupolaufspaltungen werden dabei systematisch überschätzt, und die Isomeriewerschiebungen liegen im Bereich der in der Literatur veröffentlichten Parametern. Für das oxidierte Rubredoxin aus *C. pasteurianum* ergibt sich ein positives Vorzeichen der Quadrupolaufspaltung. Allerdings liegt der Parameter  $\eta$  für diese Rechnung nahe 1 und das Vorzeichen der Quadrupolaufspaltung ist dadurch nicht sicher bestimmbar. Das Programmpaket ORCA und die von Neese [6] gegebene Eichung zur Berechnung der Isomeriewerschiebung ist anwendbar auf Rubredoxine. Die Ergebnisse der Rechnungen an dem Modellsystem des Pferdeherpes-Virus und des Modells des Bindungsplatzes sind damit stichhaltig.

Es konnte gezeigt werden, dass im Z-Protein eine diamagnetische Spezies vorhanden ist und die beiden Zentren für rubredoxinartige Liganden typische Parameter annehmen. Ferner wurde der Zerfall des Clusters unter reduktivem Stress belegt. Vergleichsrechnungen der Metallzentren aus dem Pferdeherpesvirus belegen die Existenz von zwei unterschiedlichen Parametersätzen der beiden Zentren. Die Gegenüberstellung mit Rechnungen an bekannten Rubredoxinen der Bakterien *C. pasteurianum* und *P. abyssi* belegen eine Einsetzbarkeit des ORCA Programmpakets für Rechnungen an Rubredoxinen.



## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zum einen der Mechanismus der Eisenaufnahme und der Entstehungsprozess von Magnetosomen des Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* untersucht, zum anderen das Z-Protein des Lassa Virus und die beiden Eisenschwefel-Proteine GcpE und LytB des 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweges.

### **Magnetospirillum gryphiswaldense**

Ziel der Untersuchungen des Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* war, den Entstehungsprozess der Magnetosomen nachzuvollziehen und eventuell beteiligte Zwischenstufen bei der Magnetitsynthese zu identifizieren. Die Verfolgung der zeitlichen Entwicklung der Magnetitsynthese gelang durch Induktion mit  $^{57}\text{Fe}$  nach Wachstum in eisenarmen Nährmedium.

Das Wachstum des Bakteriums *Magnetospirillum gryphiswaldense* gliedert sich in zwei Phasen. In der ersten Phase wachsen die Magnetosomen isoliert. In der zweiten Phase ordnen sich die Magnetosomen zu Ketten und bilden ein kollektives magnetisches Moment. Der Übergang aus der ersten Phase in die zweite Phase konnte mittels der Mössbauerspektroskopie, sowie der Daten aus der Transmissionselektronenmikroskopie und der magnetisch induzierten differentiellen Lichtstreuung nachvollzogen werden. Der Übergangzeitpunkt des Bakterienkollektivs aus der ersten Phase in die zweite Phase konnte zu 160 min nach der Induktion bestimmt werden. Im Mössbauerspektrum äußert sich der Übergang in die zweite Phase durch Reduktion des Hyperfeinfeldes der Magnetosomen. Diese Reduktion lässt sich erklären, wenn jedes Magnetosom als einzelnes Partikel betrachtet wird, welches sich im Feld der Nachbarmagnetosomen befindet. Dadurch koppelt dieses äußere Feld mit dem Hyperfeinfeld des Kerns und führt zu dessen gemessener Reduzierung.

In den aufgetrennten magnetotaktischen Bakterien gelang der Nachweis von Ferritin. Es konnte auch gezeigt werden, dass dieses Ferritin ein Membranbestandteil ist. Ebenso konnte dies für die unspezifisch gebundenen  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen gezeigt werden. Die isolierten Magnetosomen zeigten keine Anteile anderer Mineralien als Magnetit in der Transmissions- und Konversionselektronen-Mössbauerspektroskopie.

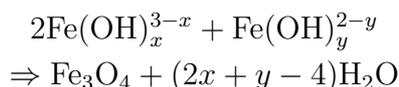
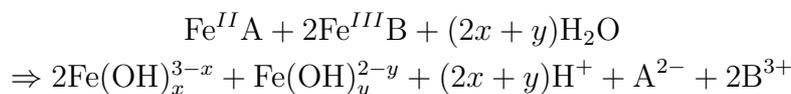
In  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Nährmedien zeigte sich bei verschiedenen Sauerstoffkonzentratio-

nen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. In der Probe mit dem aeroben Fe<sup>3+</sup> Medium war kein Magnetit nachzuweisen. In microaerober Umgebung bildete sich sowohl in Fe<sup>2+</sup>- als auch in Fe<sup>3+</sup>-Nährmedium Magnetit, wobei die Magnetitsynthese im Fall des Fe<sup>2+</sup>-Nährmediums bevorzugt ist. Dies legt nahe, dass das Bakterium einen allgemeinen Eisenpool bildet und aus diesem dann Magnetit produziert wird. Hierdurch wird auch die Existenz eines Reduktions- und Oxidationsapparates im Bakterium belegt.

Die untersuchten Mutanten  $\Delta$ mamM und  $\Delta$ mamB hatten beide die Fähigkeit zur Magnetitsynthese verloren. Eine spezifische Zwischenstufe der Magnetitsynthese ließ sich in den beiden Mutanten nicht identifizieren. In beiden Mutanten wurden nur Ferritin und eine Fe<sup>2+</sup>-Komponente identifiziert.

Auf Grundlage der obigen Ergebnisse wurde folgendes Modell entwickelt:

- Die Aufnahme von Fe<sup>3+</sup>- und Fe<sup>2+</sup>-Ionen erfolgt aus dem umgebenden Medium.
- Die Fe<sup>3+</sup>-Ionen werden als Ferritin gespeichert und sind in/an der Membran gelagert. Fe<sup>2+</sup>-Ionen werden ebenfalls in der Membran eingelagert, in Form einer nicht bekannten Verbindung. Sofern ein Mangel an einer Ionenform vorliegt, wird diese durch den Reduktions- und Oxidationsapparat bereit gestellt.
- Magnetit entsteht in einem aus der Cytoplasmamembran gebildeten Vesikel im alkalischen Medium:



- Die Magnetitkristalle lösen sich von der Membran und bilden als Magnetosomen Ketten aus.

### Die Proteine GcpE und LytB

Die Untersuchungen der beiden Proteine GcpE und LytB dienen der Aufklärung ihrer Funktionsweise im 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweg. Ziel war die Charakterisierung der isolierten Proteine und die Untersuchung des Einflusses des Substrates auf den in beiden Proteinen vorhandenen [4Fe-4S]<sup>2+</sup> Cluster.

In den Mössbauerspektren des GcpE-Proteins konnte der Cluster nachgewiesen werden. In der Probe mit Substrat zeigt sich keine signifikante Veränderung des Mössbauerspektrums. Eine Interaktion bzw. Bindung konnte für das GcpE-Protein nicht

---

nachgewiesen werden. Der Cluster zeigt zwei Komponenten, welche in einem Verhältnis von 3:1 im Mössbauerspektrum vorkommen.

Die Mössbauerspektren des LytB-Protein zeigen ebenfalls einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Cluster, dessen Komponenten im Verhältnis 3:1 auftreten. Das Mössbauerspektrum des isolierten LytB-Proteins zeigte einen  $\text{Fe}^{2+}$ -Anteil, welcher als Bestandteil des Clusters interpretiert werden konnte, wenn diese Komponenten zu 25% in das Spektrum eingehen. Die Komponenten liegen dann im Verhältnis von 2:1:1 im Cluster vor. Auch das LytB-Protein zeigt keine Veränderung unter Substratzugabe.

### **Z-Protein des Lassa Virus**

Das Z-Protein des Lassa Virus ist ein natives Zink-Protein. Ein Austausch der Zink-Ionen mit  $^{57}\text{Fe}$  erlaubt dieses Protein mittels der Mössbauerspektroskopie zu untersuchen. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Charakterisierung der beiden vermuteten Bindungszentren, sowie einer möglichen dritten Bindungsstelle auf der Proteinoberfläche. Zur Verifizierung wurden DFT-Rechnungen am Pferdeherpesvirus und den mössbauerspektroskopisch bekannten Rubredoxinen der Bakterien *C. pasteurianum* und *P. abyssi* durchgeführt.

Das Z-Protein des Lassa Virus zeigte in Hochfeld-Mössbauerspektren eine diamagnetische Spezies, welche auf ein gekoppeltes zwei Eisen-Zentrum schließen ließ. DFT-Rechnungen am Modellsystem belegten, dass die durch die Proteinstruktur angebotenen Bindungsplätze nicht für die starke Kopplung verantwortlich sein können. Das Protein bietet auf seiner Oberfläche eine mögliche dritte Bindungsstelle. DFT-Rechnungen mit einem Eisenion an dieser dritten Bindungsstelle zeigen die Möglichkeit, dass diese Bindungsstelle Eisenionen aufnehmen könnte. Vergleichsrechnungen mit Rubredoxin aus *C. pasteurianum* und *P. abyssi* belegen zum einen die Verwendbarkeit des ORCA-Pakets für rubredoxinartige Zentren, zum anderen, dass die Zentren im Z-Protein des Lassa Virus mit denen von Rubredoxinen vergleichbar sind.



# A Spincrossoverkomplex und molekulare Magnete

## A.1 Der Spincrossoverkomplex $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$

### A.1.1 NIS an $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$

Es wurde der Spincrossoverkomplex  $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$  (ptz = 1-n-propyl-tetrazole) mittels nuklearer inelastischer Streuung (NIS) am Synchrotronring in Grenoble (ES-RF) untersucht. Dabei konnten fünf verschiedene Phasen des Komplexes beobachtet werden, welche sich sowohl in ihrem Spinzustand als auch in ihrer kristallographischen Ordnung unterschieden. Es zeigt sich eine Aufspaltung der zu den high- und low-spin gehörenden NIS-Banden beim Übergang von geordneter zu ungeordneter Kristallstruktur. Die Beobachtbarkeit der kristallographischen Ordnung entsteht dabei durch die Kopplung der Fe-N Streckschwingungen mit denen der terminalen n-propyl Gruppen. Die DFT-Rechnungen dieses Komplexes belegen die Kopplung der beiden Schwingungen und geben die Ergebnisse des Experimentes wieder [E5].

### A.1.2 LIESST am $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$ -System

Der Spincrossoverkomplex  $[\text{Fe}(\text{ptz})_6](\text{BF}_4)_2$  wurde bei  $T=4,2\text{K}$  im schwachen magnetischen Feld  $B=20\text{mT}$  untersucht. Dazu wurde die Probe zwischen zwei optisch durchsichtige Plastikstücke gepresst. Die Probe hatte circa eine Fläche von  $1\text{cm}^2$  bei einer Dicke von circa  $1\text{mm}$ . Die Probe war weißlich und durchscheinend. Vor und hinter der Probe wurden je drei LEDs roter (625 nm,  $18^\circ$  Öffnungswinkel, 5000 mcd bei  $I_f=20\text{mA}$ , Chip: Cree) und grüner (505 nm,  $40^\circ$  Öffnungswinkel, 2800 mcd bei  $I_f=20\text{mA}$ , Chip: Cree) Farbe (insgesamt sechs rote und sechs grüne) in einem Abstand von  $3\text{mm}$  positioniert, so dass die Probe jeweils von vorne und hinten vollständig ausgeleuchtet werden konnte. Die beiden Farben waren getrennt ansteuerbar. Um Strahlenschäden an den LEDs auszuschliessen, wurden diese durch einen  $1\text{mm}$  Bleischild abgeschirmt. Die Steuerung der Schaltzeiten erfolgte per Hand und weist eine Genauigkeit von mindestens  $3\text{s}$  auf. Die je sechs LEDs wurden mit einem Strom von  $200\text{mA}$  betrieben, so dass jede LED einen Vorwärtsstrom von  $I_f=33,3\text{mA}$  besaß.

Die Mössbauerspektren sind in Abbildung A.1 dargestellt. Sowohl die Beleuchtung mit grünem als auch mit rotem Licht überführt den Komplex in die metastabile

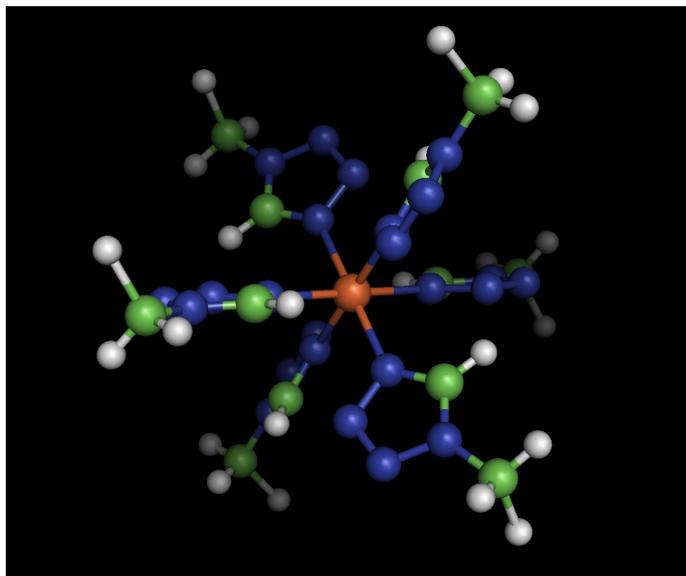


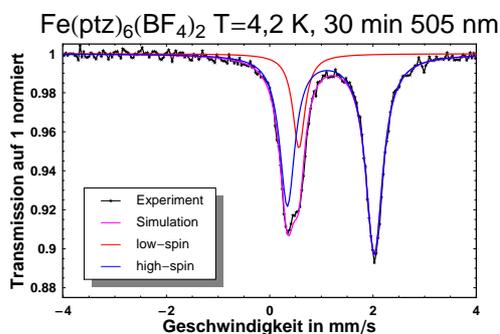
Abbildung A.1: Spincrossoverkomplex  $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$

LIESST<sup>1</sup>-Phase [121, 122, 123]. Dabei ist zu beobachten, dass die Beleuchtung mit grünem Licht effektiver erscheint, da bereits nach 30-minütiger Beleuchtung 83,1 % in den high-spin Zustand überführt werden konnten, während es bei rotem Licht nur 75,6 % sind, obwohl die vom Hersteller angegebene Lichtstärke der grünen LEDs nur 56 % gegenüber den roten LEDs beträgt. Nach einer Stunde ist bei beiden Farben der gesamte Komplex in den high-spin Zustand übergegangen. Erwähnt werden sollte hier, dass oftmals rotes Licht zur Vernichtung des LIESST-Zustandes genutzt wird. Dieses rote Licht liegt aber im Bereich oberhalb von 800 nm und damit über 175 nm von der verwendeten Wellenlänge entfernt.

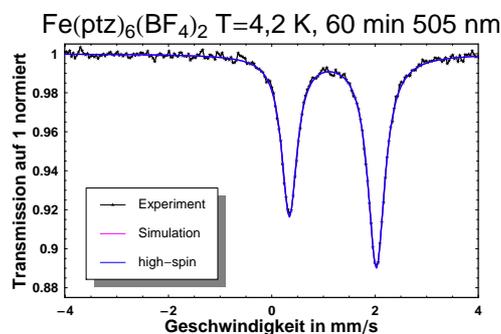
Die asymmetrische Linienform des high-spin Zustandes wird dem polykristallinen Zustand der Probe zugerechnet [70, 69]. Die Probe liegt nicht in perfekter Pulverform, sondern in Mikrokristallen vor, welche vorzugsweise in Plättchenform vorkommen. Durch die Probenpräparation zwischen zwei Plasticscheiben wurde der Probe eine Vorzugsrichtung in der Orientierung der Mikrokristalle gegeben. Zur Anpassung der Spektren wurde deshalb ein asymmetrisches Lorentz Dublett mit einer Winkelabhängigkeit verwendet. Im Fit wird dieser Winkel zu  $\Theta=39,7$  Grad bestimmt. Die Parameter der Mössbauerspektren sind für den low-spin Zustand  $\delta=0,56 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=1,68 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,39 \text{ mms}^{-1}$ . Für den high-spin Zustand ergeben sich die Parameter zu  $\delta=1,18 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=1,68 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,51$  und  $0,44 \text{ mms}^{-1}$ . Für den high-spin Zustand bei  $T=135 \text{ K}$  verändern sich die Parameter zu  $\delta=1,17 \text{ mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=1,47 \text{ mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,28$  und  $0,33 \text{ mms}^{-1}$ . Der Winkel  $\Theta$  wurde in beiden Fällen

---

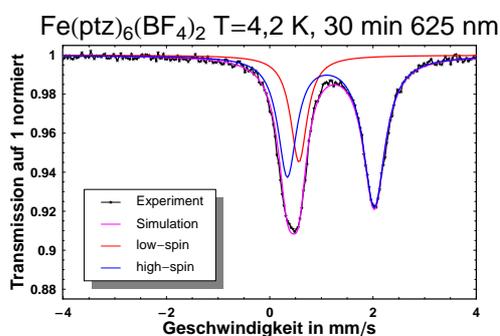
<sup>1</sup>LIESST: Light-Induced Excited Spin State Trapping



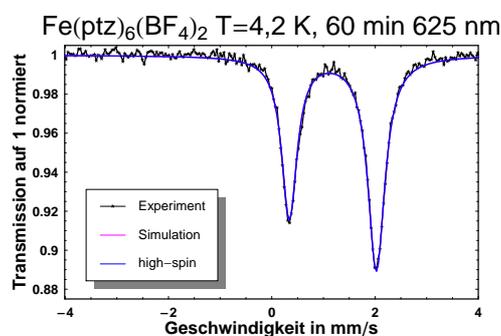
(a) Mössbauerspektrum nach 30 min Beleuchtung mit 505 nm Licht



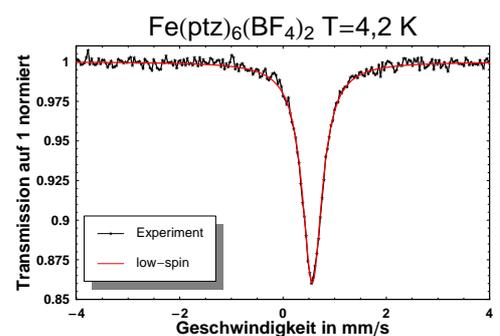
(b) Mössbauerspektrum nach 60 min Beleuchtung mit 505 nm Licht



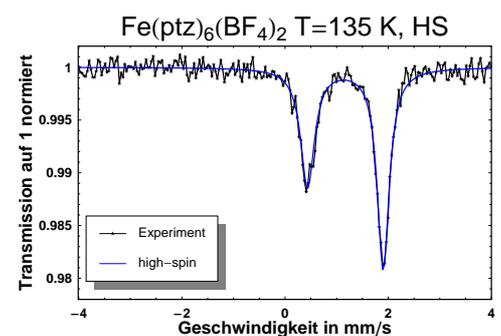
(c) Mössbauerspektrum nach 30 min Beleuchtung mit 625 nm Licht



(d) Mössbauerspektrum nach 60 min Beleuchtung mit 625 nm Licht



(e) Mössbauerspektrum ohne Beleuchtung,  $T=4,2$  K, low-spin



(f) Mössbauerspektrum ohne Beleuchtung,  $T=135$  K, high-spin

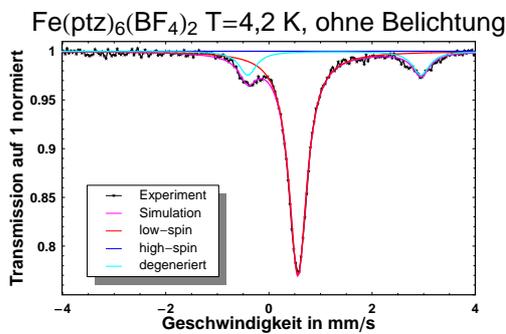
Abbildung A.2: LIESST-Effekt am  $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ -System, induziert durch Beleuchtung mit verschiedenfarbigen LEDs.

identisch zu  $\Theta=39,7$  Grad bestimmt.

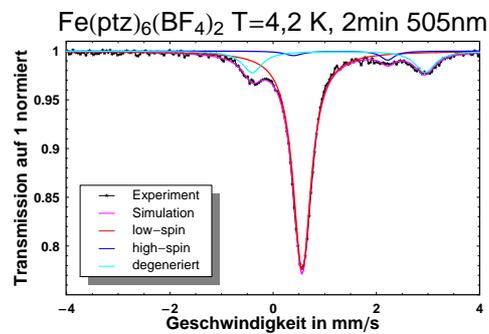
In den Abbildungen A.3 und A.4 sind die Mössbauerspektren des gleichen Komplexes mit verschiedenen Bestrahlungsdauern dargestellt. Die Probe ist dieselbe, welche auch für die vorangegangenen Messungen verwendet wurde, nur dass sie zwei Monate bei Raumluft, normaler Tageshelligkeit und Raumtemperatur im Probenhalter gelagert wurde und nun eine leicht gelblich-bräunliche Färbung zeigt. Der Strom wurde auf 120 mA reduziert (Vorwärtsstrom  $I_f=20$  mA), um die Bildung des high-spin Anteils besser verfolgen zu können. Das Mössbauerspektrum in Abbildung A.3 (a) zeigt zusätzlich zu dem erwarteten low-spin Zustand ein weiteres  $\text{Fe}^{2+}$ -high-spin Dublett mit den Parametern  $\delta=1,28$   $\text{mms}^{-1}$ ,  $\Delta E_Q=3,40$   $\text{mms}^{-1}$  und  $\Gamma=0,42$   $\text{mms}^{-1}$  im Vergleich zu dem vorher gemessenen Zustand (Abbildung A.2 (e)). Der low-spin und lichtinduzierte high-spin Zustand lässt sich durch die bereits gewonnenen Parameter anpassen.

In Abbildung A.5 sind die high-spin und low-spin Anteile nach verschiedenen Beleuchtungszeiten aufgetragen. Zusätzlich ist die jeweilige Zeit dargestellt, welche zur Messung des Mössbauerspektrums benötigt wurde. Der high-spin Anteil der Serie steigt nicht kontinuierlich und zeigt sogar Rückgänge bei 10 min und 60 min Beleuchtungsdauer. Dieser Rückgang belegt, dass der high-spin Zustand nicht stabil sein kann. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine Halbwertszeit des metastabilen high-spin Zustandes. Betrachtet man die benötigte unterschiedliche Messdauer der Einzelspektren, so zeigt sich, dass bei langer Messzeit auch die beiden beobachteten Rückgänge des high-spin Anteils liegen. Die high-spin Zustände haben bei längerer Messzeit mehr Zeit zu zerfallen. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten der Halbwertszeit des ansonsten stabilen high-spin Zustandes [124, 125] liegt in dem Anteil von degenerierten Komplexen. Es ist bekannt, dass der LIESST-Effekt auf kooperativer Effekten [126, 127] beruht und die Umgebung der LIESST-Atome einen Einfluss haben. Der Anteil der degenerierten Komplexe beträgt circa 19%, so dass ungefähr jeder fünfte Komplex ein degenerierter Komplex ist und somit durchschnittlich jeder Komplex einen degenerierten Komplex als Nachbarn hat. Diese Nachbarn und deren Störung des kooperativen Effektes mögen ein Erklärung für das Auftreten der beobachteten Halbwertszeit sein.

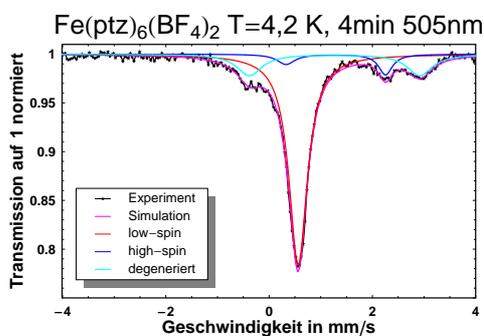
Es konnte gezeigt werden, dass der LIESST-Effekt durch LEDs hervorgerufen werden kann. Es wurde ebenso ein Unterschied in der Effektivität des Übergangs zwischen den verwendeten Farben festgestellt, wobei hier zu beachten ist, dass die emittierte Wellenlänge des Halbleiters ebenfalls von der Temperatur abhängig ist und daher nicht die Wellenlängen emittiert, welche bei Raumtemperatur zu beobachten sind. Eine Messreihe mit der zum Teil degenerierten Probe zeigt das Auftreten einer Halbwertszeit, welche vermutlich durch das Vorhandensein von degenerierten Komplexen innerhalb der Probe bedingt wird.



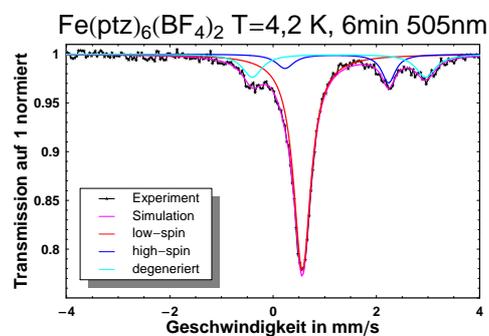
(a) ohne Bestrahlung



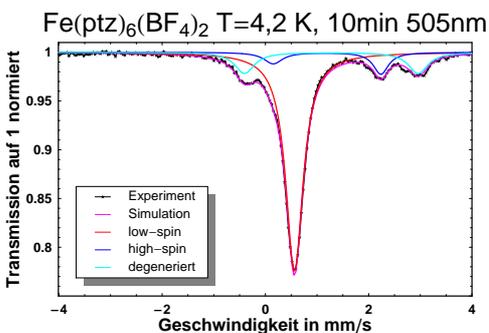
(b) 2 min mit 505 nm Licht



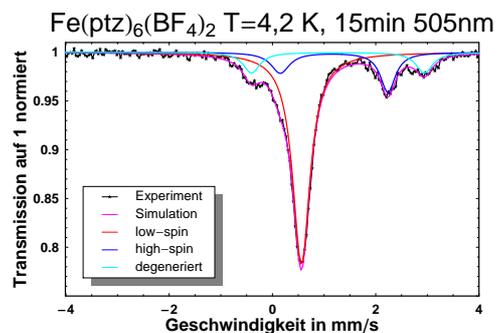
(c) 4 min mit 505 nm Licht



(d) 6 min mit 505 nm Licht



(e) 10 min mit 505 nm Licht



(f) 15 min mit 505 nm Licht

Abbildung A.3: LIESST-Effekt am  $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ -System (II), an einem degenerierten Komplex nach verschiedenen Bestrahlungsdauern. Die Zeiten geben Gesamtbeleuchtungszeiten an.

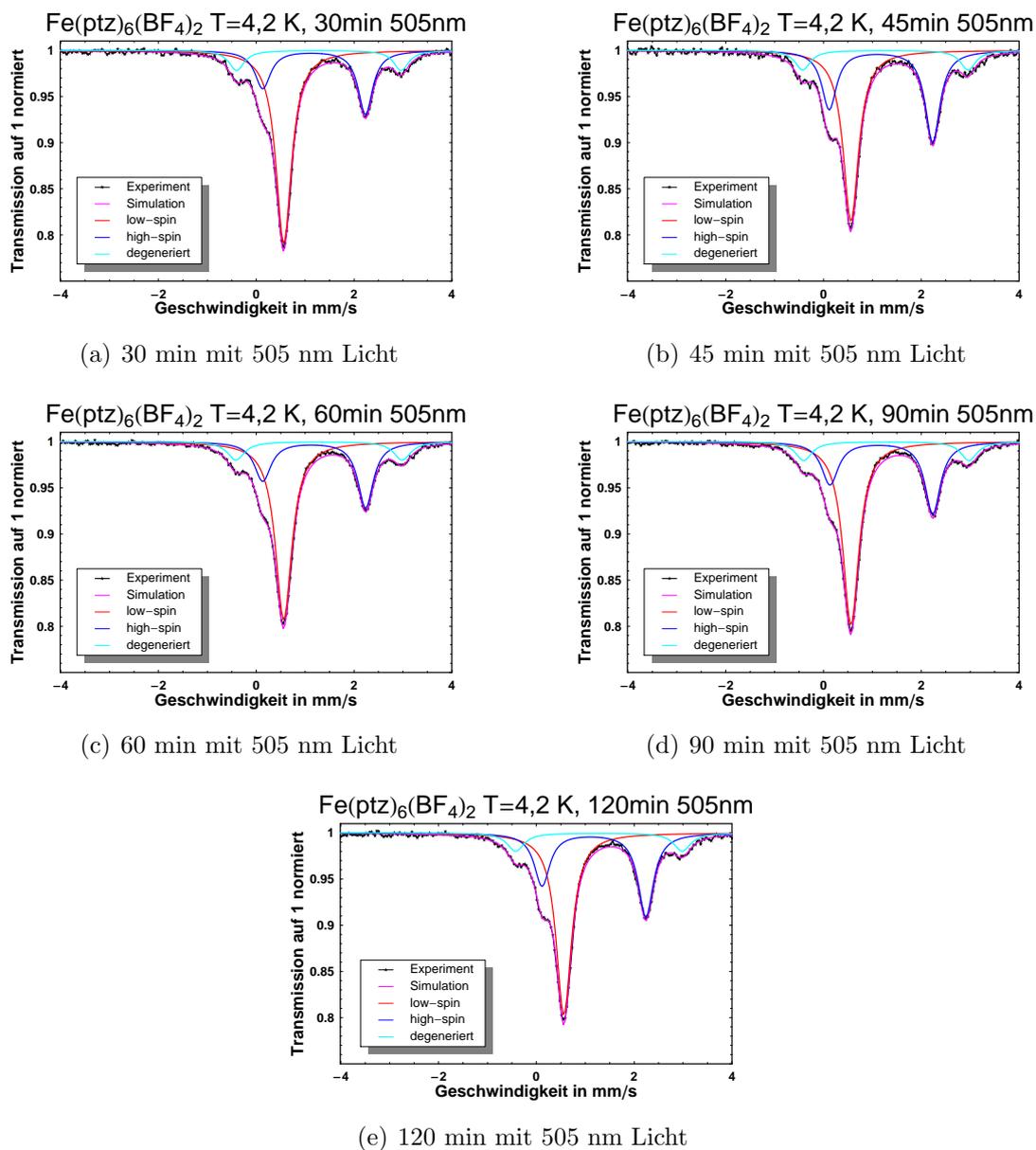


Abbildung A.4: LIESST-Effekt am  $\text{Fe}(\text{ptz})_6(\text{BF}_4)_2$ -System (II), an einem degenerierten Komplex nach verschiedenen Bestrahlungsdauern. Die Zeiten geben Gesamtbeleuchtungszeiten an.

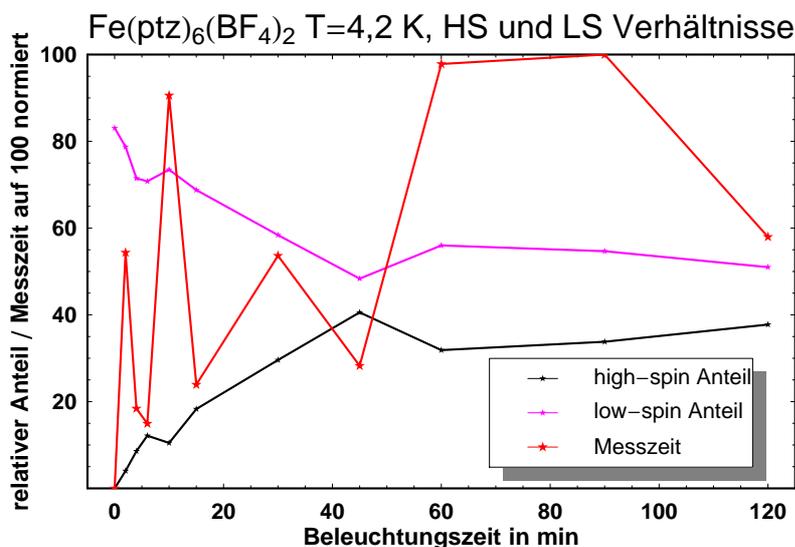


Abbildung A.5: Korrelation zwischen dem high-spin Anteil und der Messzeit des Spektrums beim  $(\text{Fe}(\text{ptz})_6(\text{BF}_4)_2)$  Komplex.

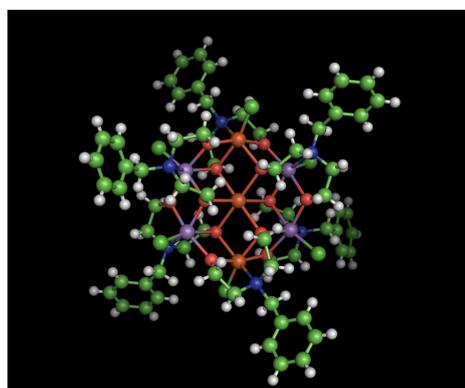
## A.2 Molekulare Magnete

Große mehrkernige Komplexe eignen sich als molekulare Magnete mit konstruierbaren magnetischen Eigenschaften. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei solcher molekularen Magnete charakterisiert [E6, E7].

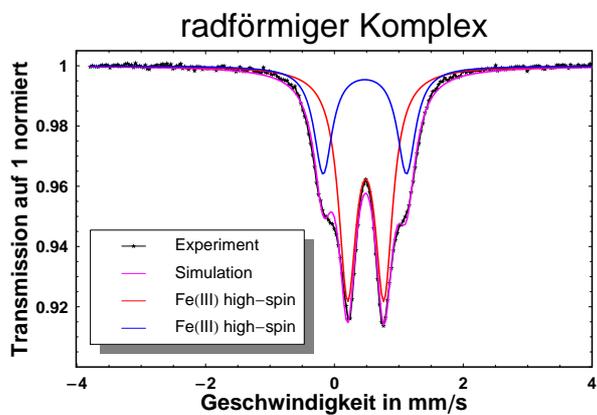
Der erste Komplex ist ein heptanukleares metallisches Rad mit vier Manganionen und drei Eisenionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in zwei verschiedenen kristallographischen Umgebungen (siehe Abbildung A.6). Das erwartete Verhältnis von 2:1 in den beiden Komponenten konnte durch die Mössbauerspektroskopie belegt werden.

Der zweite Komplex ist ein achtkerniges Molekül ( $\text{Fe}_4^{2+}\text{Fe}_4^{3+}(\text{L}^3)_6\text{Cl}_4\text{O}_2$ ) mit 4  $\text{Fe}^{2+}$  und 4  $\text{Fe}^{3+}$  (siehe Abbildung A.7) in insgesamt vier verschiedenen kristallographischen Umgebungen. Das Verhältnis der Komponenten von 2:2:2:2 konnte durch die Mössbauerspektroskopie bestätigt werden. Durch Oxidation an Luft geht der Komplex über in ( $\text{Fe}_2^{2+}\text{Fe}_6^{3+}(\text{L}^3)_6\text{Cl}_6\text{O}_2$ ), zeigt aber weiterhin ein Verhältnis von 2:2:2:2 in den Komponenten, nun allerdings mit 2  $\text{Fe}^{2+}$  und 6  $\text{Fe}^{3+}$ , die wiederum in insgesamt 4 unterschiedlichen kristallographischen Umgebungen vorliegen. Auch für den oxidierten Komplex konnte die Mössbauerspektroskopie die erwarteten Linienintensitäten und die vier verschiedenen Spezies belegen.

Der dritte Komplex, das neunkerniges Eisenmolekül  $\text{Na}_3[\text{Fe}_9^{3+}(\text{L}^3)_8\text{Cl}_4\text{O}_6(\text{CaCl})_2]$  (siehe Abbildung A.8), besitzt drei verschiedenen kristallographischen Umgebungen, welche in einem Verhältnis von 4:1:4 auftreten.

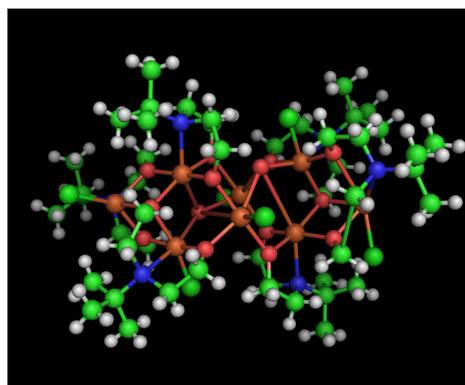


(a) Molekülstruktur

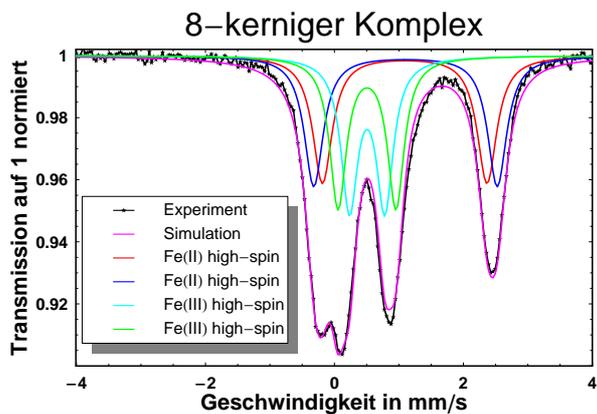


(b) Mössbauerspektrum

Abbildung A.6: Komplex  $(PPh_4)(Fe^{3+} \subset (Fe_2^{3+}Mn_4^{2+}Cl_6(L^1)_6))$

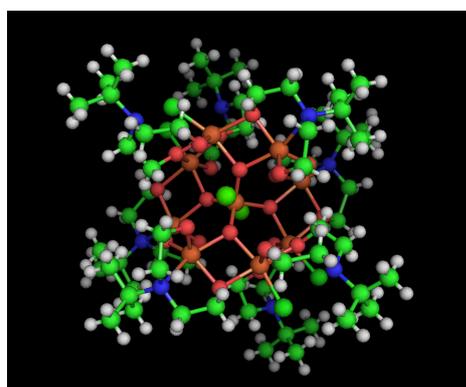


(a) Molekülstruktur

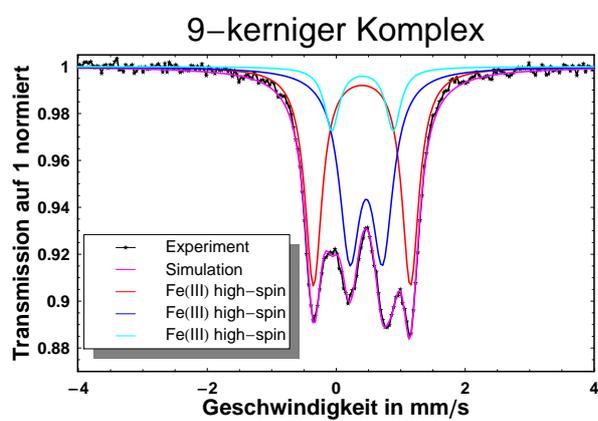


(b) Mössbauerspektrum

Abbildung A.7: Komplex  $Fe_4^{II}Fe_4^{III}(L^3)_6Cl_4O_2$



(a) Molekülstruktur



(b) Mössbauerspektrum

Abbildung A.8: Komplex  $\text{Na}_3\text{-(Fe}^{III}\text{(L}^3\text{))}_8\text{Cl}_4\text{O}_6\text{(CaCl)}_2$



## **B Weitere Mössbauerspektren**

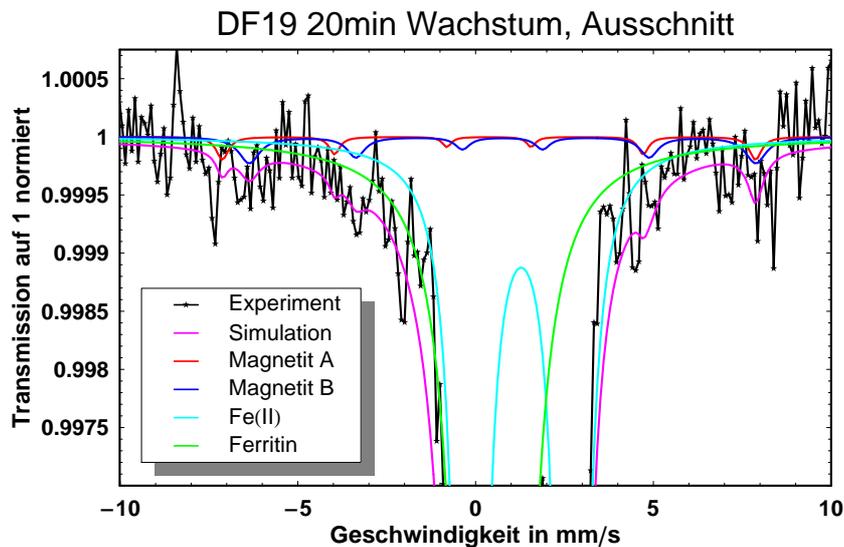


Abbildung B.1: Vergrößerung der Probe DF19 bei  $T=130$  K. Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, welche durch eine Führungslinie verbunden wurden.

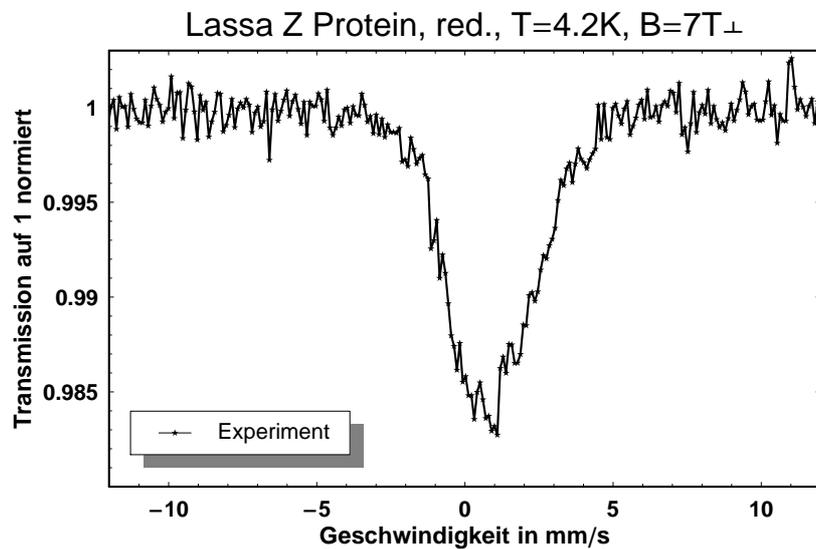


Abbildung B.2: Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, welche durch eine Führungslinie verbunden wurden.

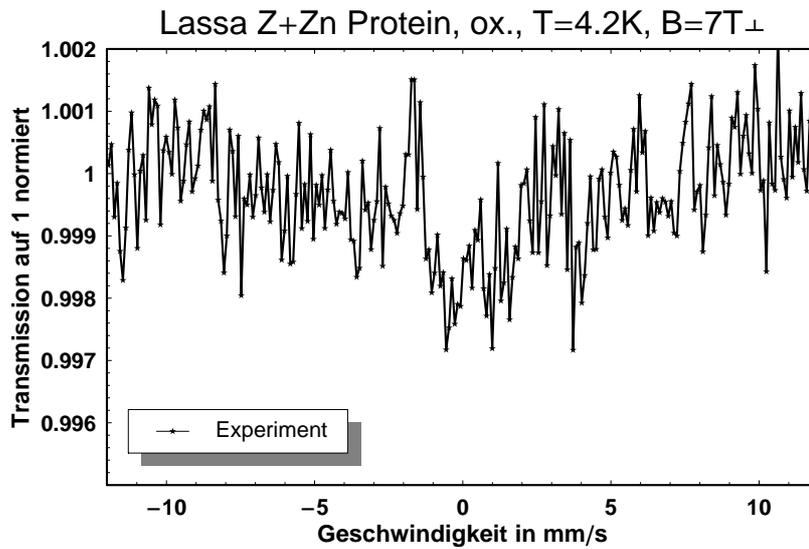


Abbildung B.3: Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins mit Zink-Anteil  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, welche durch eine Führungslinie verbunden wurden.

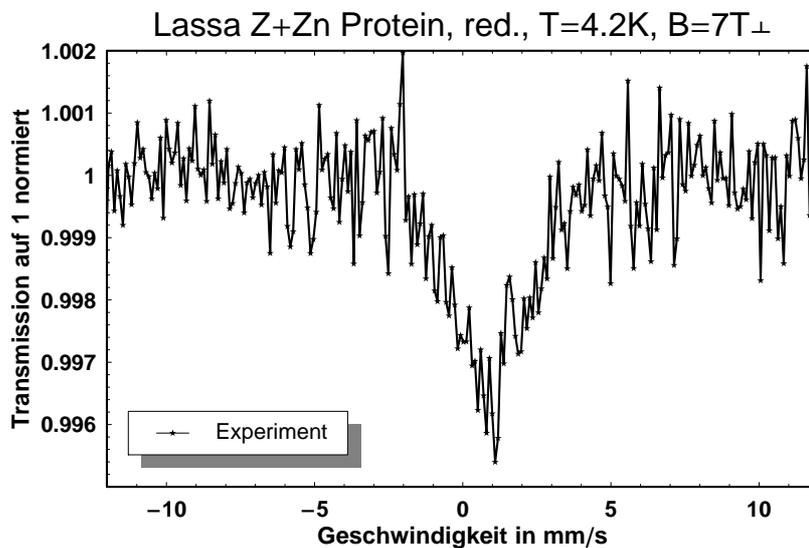


Abbildung B.4: Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins mit Zink-Anteil  
Die schwarzen Sterne geben die Messpunkte wieder, welche durch eine Führungslinie verbunden wurden.



## C Quellenverzeichnis fremder Bilder

Die Elektronenmikroskopbilder (Abbildungen 3.1, 3.9, und ) wurden von Dr. Damien Faivre, Max Planck Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen (Gruppe von Prof. Dr. Dirk Schüler, Institut für Biology, LMU München) erstellt. Die TEM-holographischen Aufnahmen (Abbildung 3.10 und 3.11) wurden in der Gruppe von R. F. Dunin-Borkowski, Dept. of Material Science, University of Camebridge, UK erstellt.

Das Bild des Reaktionsweges 4.1 wurde von Dr. M. Seemann, Université Louis Pasteur/CNRS, Institut Le Bel, Straßburg, Frankreich zur Verfügung gestellt.

Das Bilder der Gele (Abbildungen 3.31 und 3.32) wurden im Isotopenlabor der Technisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Lübeck erstellt.



# Literaturverzeichnis

- [1] P. Gütlich, R. Link und A. X. Trautwein. *Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry*. Springer-Verlag (1978).
- [2] R. L. Mössbauer. *Kernresonanzfluoreszenz von Gammastrahlung in Ir<sup>191</sup>*. Zeitschrift für Physik **151**, 124–143 (1958). Ermittlung des Kern-Wirkungsquerschnitts.
- [3] R. L. Mössbauer. *Kernresonanzabsorption von Gammastrahlung in Ir<sup>191</sup>*. Naturwissenschaften **45**, 538–539 (1958).
- [4] R. L. Mössbauer. *Kernresonanzabsorption von  $\gamma$ -Strahlung in Ir<sup>191</sup>*. Zeitschrift für Naturforschung **14a**, 211–216 (1959).
- [5] H. Wegener. *Der Mössbauer-Effekt und seine Anwendung in Physik und Chemie*. Hochschultaschenbuch-Verlag (1965).
- [6] F. Neese. *Prediction and interpretation of the <sup>57</sup>Fe isomer shift in Mössbauer spectra by density functional theory*. Inorganica Chimica Acta **337**, 181–192 (2002).
- [7] G. K. Shenoy und F. E. Wagner, Herausgeber. *Mössbauer Isomer Shifts*. North-Holland (1978).
- [8] P. Dufek, P. Blaha und K. Schwarz. *Determination of the Nuclear Quadrupole Moment of <sup>57</sup>Fe*. Physical Review Letters **75(19)**, 3545–3548 (1995).
- [9] F. Neese. *Orca Program Package*.
- [10] C. Cohen-Tannoudji, B. Diu und F. Laloë. *Quantenmechanik*. de Gruyter (1999).
- [11] A. Lindner. *Grundkurs Theoretische Physik*. Teubner Studienbücher (1997).
- [12] G. Schatz und A. Weidinger. *Nukleare Festkörperphysik*. Teubner Studienbücher (1985).
- [13] V. Schünemann und H. Winkler. *Structure and dynamics of biomolecules studied by Mössbauer spectroscopy*. Rep. Prog. Phys. **63**, 263–353 (2000).

- [14] A. X. Trautwein, E. Bill, E. L. Bominaar und H. Winkler. *Iron-Containing Proteins and Related Analogs - Complementary Mössbauer, EPR and Magnetic Susceptibility Studies*. Structure and Bonding **78**, 1–96 (1991).
- [15] S. Mørup. *Paramagnetic and Superparamagnetic Relaxation Phenomena studied by Mössbauer Spectroscopy*. Dissertation, Laboratory of Applied Physics II (1981). Scanned.
- [16] R. F. Butler und S. K. Banerjee. *Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite*. Journal Geophysical Research **80**, 4049–4058 (1975).
- [17] S. Mørup, J. A. Dumesic und Topsøe. *Applications of Mössbauer Spectroscopy*, Band II, Kapitel Magnetic Microcrystals, Seiten 1–51. Academic Press (1980).
- [18] T. Fließbach. *Elektrodynamik*. Spektrum Akademischer Verlag (1997).
- [19] J. D. Jackson. *Classical Electrodynamics*. John Wiley & Sons (1975).
- [20] D. J. Griffiths. *Introduction to Electrodynamics*. Prentice Hall, 3 Auflage (1999).
- [21] L. Néel. *Théorie du trainage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites*. Annales de Geophysique **5**, 99 (1949).
- [22] W. F. Brown Jr. *Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle*. Journal of Applied Physics **34**, 1319–1320 (1963).
- [23] W. F. Brown Jr. *Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle*. Physical Review **130**, 1677–1686 (1963).
- [24] F. G. West. *General Superparamagnetic Behavior of an Aligned Assembly of Uniaxially Anisotropic Particles*. Journal of Applied Physics **32(3)**, S249–S250 (1961).
- [25] S. Mørup und H. Topsøe. *Mössbauer studies of thermal excitations in magnetically ordered microcrystals*. Applied Physics A: Materials Science & Processing **V11(1)**, 63–66 (1976).
- [26] J. Knudsen und S. Mørup. *The influence of the demagnetizing field on the magnetic splitting of Mössbauer spectra*. Journal de Physique **41**, C1–155–C1–156 (1980).
- [27] H. P. Gunnlaugsson. *Vinda User Manual* (2000).

- [28] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. M. Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople. *Gaussian 03, Revision B.01*. Gaussian, Inc., Pittsburgh PA (2003).
- [29] R. P. Blakemore. *Magnetotactic bacteria*. *Science* **190**, 377–379 (1975).
- [30] R. P. Blakemore, R. B. Frankel und A. J. Kalmijn. *South-seeking magnetotactic bacteria in the Southern Hemisphere*. *Nature* **286**, 384–385 (1980).
- [31] R. B. Frankel, R. P. Blakemore, F. F. T. De Araujo, D. M. S. Esquivel und J. Danon. *Magnetotactic Bacteria at the Geomagnetic Equator*. *Science* **212**, 1269–1270 (1981).
- [32] S. L. Simmons, D. A. Bazylinski und K. J. Edwards. *South-Seeking Magnetotactic Bacteria in the Northern Hemisphere*. *Science* **311**, 371–374 (2006).
- [33] R. B. Frankel, R. P. Blakemore und R. S. Wolfe. *Magnetite in Freshwater Magnetotactic Bacteria*. *Science* **203**, 1355–1356 (1979).
- [34] D. A. Bazylinski, R. B. Frankel, B. R. Heywood, S. Mann, J. W. King, P. L. Donaghay und A. K. Hanson. *Controlled Biomineralization of Magnetite ( $Fe_3O_4$ ) and Greigite ( $Fe_3S_4$ ) in a Magnetotactic Bacterium*. *Applied and Environmental Microbiology* **61(9)**, 3232–3239 (1995).
- [35] R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. S. Johnson und B. L. Taylor. *Magneto-aerotaxis in marine coccoid bacteria*. *Biophysical Journal* **73(2)**, 994–1000 (1997).
- [36] D. A. Bazylinski und R. B. Frankel. *Magnetosome Formation in Prokaryotes*. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 217–230 (2004).

- [37] F. Rodgers, R. P. Blakemore, N. Blakemore, R. P. Frankel, D. Bazylinski, D. Maratea und C. Rodgers. *Intercellular structure in a many-celled magnetotactic prokaryote*. Archives of Microbiology **154**(1), 18–22 (1990).
- [38] D. L. Balkwill, D. Maratea und R. P. Blakemore. *Ultrastructure of a Magnetotactic spirillum*. Journal of Bacteriology **141**(3), 1399–1408 (1980).
- [39] K. M. Towe und T. T. Moench. *Electron-optical characterization of bacterial magnetite*. Earth and Planetary Science Letters **52**(1), 213–220 (1981).
- [40] S. Mann, N. H. C. Sparks, R. Frankel, D. Bazylinski und H. Jannasch. *Biomining of ferrimagnetic greigite ( $Fe_3S_4$ )*. Nature **343**, 258–261 (1990).
- [41] M. Farina, D. M. S. Esquivel und H. G. P. L. de Barros. *Magnetic iron-sulphur crystals from a magnetotactic microorganism*. Nature **343**, 256–258 (1990).
- [42] M. Pósfai, P. R. Buseck, D. A. Bazylinski und R. B. Frankel. *Reaction Sequence of Iron Sulfide Minerals in Bacteria and Their Use as Biomarkers*. Science **280**, 880–883 (1998).
- [43] D. A. Bazylizinki, B. R. Heywood, S. Mann und R. B. Frankel.  *$Fe_3O_4$  and  $Fe_3S_4$  in a bacterium*. Nature **366**, 218 (1993).
- [44] T. T. Moench und W. A. Konetzka. *A novel method for the isolation and study of a magnetotactic bacterium*. Archives of Microbiology **119**(2), 203–212 (1978).
- [45] R. P. Blakemore, D. Maratea und R. S. Wolfe. *Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium*. Journal of Bacteriology **140**(2), 720–729 (1979).
- [46] A. Arakaki, J. Webb und T. Matsunaga. *A Novel Protein Tightly Bound to Bacterial Magnetic Particles in Magnetospirillum magneticum Strain AMB-1*. Journal of Biological Chemistry **278**(10), 8745–8750 (2003).
- [47] Y. A. Gorby, T. J. Beveridge und R. P. Blakemore. *Characterization of the bacterial magnetosome membrane*. Journal of Bacteriology **170**(2), 834–841 (1988).
- [48] A. Scheffel, M. Gruska, D. Faivre, A. Linaroudis, J. M. Plitzko und D. Schüler. *An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria*. Nature **440**, 110–114 (2006).
- [49] R. B. Frankel und D. A. Bazylinski. *How magnetotactic bacteria make magnetosomes queue up*. Trends in Microbiology **14**, 329–331 (2006).

- 
- [50] R. E. Dunin-Borkowski, M. R. McCartney, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, M. Pósfai und P. Buseck. *Magnetic Microstructure of Magnetotactic Bacteria by Electron Holography*. *Science* **282**, 1868–1870 (1998).
- [51] R. B. Frankel und R. P. Blakemore. *Navigational compass in magnetic bacteria*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **15-18(Part 3)**, 1562–1564 (1980).
- [52] R. B. Frankel. *Magnetic Guidance of Organisms*. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **13(1)**, 85–103 (1984).
- [53] U. Heyen und D. Schüller. *Growth and magnetosome formation by microaerophilic Magnetospirillum strains in an oxygen-controlled fermentor*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61(5 - 6)**, 536–544 (2003).
- [54] K. N. Raymond, G. I. Müller und B. F. Matzanke. *Complexation of Iron by Siderophores. A Review of Their Solution and Structural Chemistry and Biological Function*. *Topics in Current Chemistry* **123**, 49–102 (1984).
- [55] H. Boukhalfa und A. L. Crumbliss. *Chemical aspects of siderophore mediated iron transport*. *BioMetals* **V15(4)**, 325–339 (2002).
- [56] A. Butler. *Marine Siderophores and Microbial Iron Mobilization*. *BioMetals* **V18(4)**, 369–374 (2005).
- [57] B. F. Matzanke. *Iron Transport: Siderophores*. In R. B. King, Herausgeber, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Band IV, Seiten 2619–2646. Wiley publishers (2005).
- [58] B. F. Matzanke, S. Anemüller, V. Schünemann, A. X. Trautwein und K. Hantke. *FhuF - the first example of a hydroxamate siderophore reductase*. *Biochemistry* **43**, 1386–1392 (2004).
- [59] T. Suzuki, Y. Okamura, R. J. Calugay, H. Takeyama und T. Matsunaga. *Global Gene Expression Analysis of Iron-Inducible Genes in Magnetospirillum magneticum AMB-1*. *Journal of Bacteriology* **188(6)**, 2275–2279 (2006).
- [60] R. J. Calugay, H. Miyashita, Y. Okamura und T. Matsunaga. *Siderophore production by the magnetic bacterium Magnetospirillum magneticum AMB-1*. *FEMS Microbiology Letters* **218(2)**, 371–375 (2003).
- [61] D. Schüller und E. Baeuerlein. *Iron-limited growth and kinetics of iron uptake in Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Archives of Microbiology* **166(5)**, 301–307 (1996).

- [62] K. W. Mandernack, D. A. Bazylinski, I. Shanks, Wayne C. und T. D. Bullen. *Oxygen and Iron Isotope Studies of Magnetite Produced by Magnetotactic Bacteria*. *Science* **285**, 1892–1896 (1999).
- [63] S. Schübbe, M. Kube, A. Scheffel, C. Wawer, U. Heyen, A. Meyerdierks, M. H. Madkour, F. Mayer, R. Reinhardt und D. Schüler. *Characterization of a Spontaneous Nonmagnetic Mutant of Magnetospirillum gryphiswaldense Reveals a Large Deletion Comprising a Putative Magnetosome Island*. *Journal of Bacteriology* **185(19)**, 5779–5790 (2003).
- [64] D. Schüler und E. Baeuerlein. *Dynamics of Iron Uptake and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Biomineralization during Aerobic and Microaerobic Growth of Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of Bacteriology* **180(1)**, 159–162 (1998).
- [65] W. H. Bragg. *The structure of magnetite and the spinels*. *Nature* **95**, 561 (1915).
- [66] R. J. Hill, J. R. Craig und G. V. Gibbs. *Systematics of the spinel structure type*. *Physics and Chemistry of Minerals* **4(4)**, 317–339 (1979).
- [67] G. A. Samara und A. A. Giardini. *Effect of Pressure on the Néel Temperature of Magnetite*. *Phys. Rev.* **186(2)**, 577– (1969).
- [68] R. Cornell und U. Schwertmann. *The Iron Oxides*. VCH Verlagsgesellschaft (1996).
- [69] Greenwood und Gibb. *Mössbauer Spectroscopy*. Chapman and Hall Ltd, London (1971).
- [70] V. I. Goldanskii und E. F. Makarov. *Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy*. Academic Press (1968).
- [71] D. Schüler und M. Köhler. *The isolation of a new magnetic bacterium*. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **147**, 150–151 (1992).
- [72] K. Grünberg, C. Wawer, B. M. Tebo und D. Schüler. *A Large Gene Cluster Encoding Several Magnetosome Proteins Is Conserved in Different Species of Magnetotactic Bacteria*. *Applied and Environmental Microbiology* **67(10)**, 4573–4582 (2001).
- [73] D. Schüler, R. Uhl und E. Baeuerlein. *A simple light scattering method to assay magnetism in Magnetospirillum gryphiswaldense*. *FEMS Microbiology Letters* **132(1-2)**, 139–145 (1995).
- [74] S. Mann, R. B. Frankel und R. P. Blakemore. *Structure, morphology and crystal growth of bacterial magnetite*. *Nature* **310**, 405–407 (1984).

- [75] H. Stamerjohanns. *Optimierte Datenanalyse mit Anwendung auf klassische Spinsysteme und atomare Cluster*. Dissertation (1997).
- [76] D. Faivre, L. H. Böttger, B. F. Matzanke und D. Schüler. *Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds via a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and ferrous iron species*. *Angewandte Chemie* Seite akzeptiert (2007).
- [77] W. Demtröder. *Experimentalphysik 2*. Springer-Verlag (1995).
- [78] B. F. Matzanke, E. Bill und A. X. Trautwein. *Main components of iron metabolism in microbial systems - analyzed by in vivo Mössbauer spectroscopy*. *Hyperfine Interactions* **71**, 1259–1262 (1992).
- [79] R. Böhnke und B. F. Matzanke. *The mobile ferrous iron pool in Escherichia coli is bound to a phosphorylated sugar derivative*. *BioMetals* **8**, 223–230 (1995).
- [80] B. F. Matzanke. *Iron storage in microorganism*. In G. Winkelmann und C. Carrano, Herausgeber, *Transition metals in microbial metabolism*, Seiten 117–157. Harwood academic publishers (1997).
- [81] B. F. Matzanke, D. J. Ecker, T.-S. Yang, B. H. Huynh, G. Müller und K. N. Raymond. *Escherichia coli Iron Enterobactin Uptake monitored by Mössbauer Spectroscopy*. *Journal of Bacteriology* **167**, 674–680 (1986).
- [82] R. B. Frankel, G. C. Papaefthymiou, R. P. Blakemore und W. O'Brien. *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> precipitation in magnetotactic bacteria*. *Biochemica et Biophysica Acta* **763**, 147–159 (1983).
- [83] D. Schüler und R. B. Frankel. *Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52(4)**, 464–473 (1999).
- [84] A. Komeili, Z. Li, D. K. Newman und G. J. Jensen. *Magnetosomes Are Cell Membrane Invaginations Organized by the Actin-Like Protein MamK*. *Science* **311**, 242–245 (2006).
- [85] O. Wallach. *Zur Kenntniß der Terpene und der ätherischen Oele*. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **227**, 277–302 (1885).
- [86] F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning und I. Kessel. *Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl-Δ-butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens*. *Angewandte Chemie* **24**, 738–742 (1958).
- [87] G. Löffler und P. E. Petrides. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer (1997).

- [88] C. E. Mortimer und U. Müller. *Chemie*. Thieme (2001).
- [89] T. J. Bach und H. K. Lichtenthaler. *Mechanisms of Inhibition by Mevinolin (MK 803) of Microsome-Bound Radish and of Partially Purified Yeast HMG-CoA Reductase (EC.1.1.1.34)*. *Zeitschrift für Naturforschung* **38c**, 212–219 (1983).
- [90] M. Rohmer. *Mevalonate-independent methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis. Elucidation and distribution*. *Pure and Applied Chemistry* **75(2-3)**, 375–387 (2003).
- [91] M. Seemann, N. Campos, M. Rodriguez-Concepcion, E. Ibanez, T. Duvold, D. Tritsch, A. Boronat und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (E)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol*. *Tetrahedron Letters* **43**, 1413–1415 (2002).
- [92] M. Seemann, N. Campos, M. Rodriguez-Concepcion, J.-F. Hoeffler, C. Grosdemange-Billiard, A. Boronat und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: accumulation of 2-C-methyl-Image-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in a gcpE deficient mutant of Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters* **43**, 775–778 (2002).
- [93] M. Wolff, M. Seemann, B. Tse Sum Bui, Y. Frapart, D. Tritsch, A. G. Estrabot, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat, A. Marquet und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from Escherichia coli is a [4Fe-4S] protein*. *FEBS Letters* **541(1-3)**, 115–120 (2003).
- [94] M. Wolff, M. Seemann, C. Grosdemange-Billiard, D. Tritsch, N. Campos, M. Rodriguez-Concepcion, A. Boronat und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from Escherichia coli*. *Tetrahedron Letters* **43**, 2555–2559 (2002).
- [95] M. Seemann, P. Wegner, V. Schünemann, B. Tse Sum Bui, M. Wolff, A. Marquet, A. X. Trautwein und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis in chloroplasts via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) from Arabidopsis thaliana is a [4Fe-4S] protein*. *J Biol Inorg Chem* **10**, 131–137 (2005).
- [96] M. Seemann, B. Tse Sum Bui, M. Wolff, M. Miginiac-Maslow und M. Rohmer. *Isoprenoid biosynthesis in plant chloroplasts via the MEP pathway: Direct*

- thylakoid/ferredoxin-dependent photoreduction of GcpE/IspG*. FEBS Letters **580(6)**, 1547–1552 (2006).
- [97] M. Seemann, B. Tse Sum Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet und M. Rohmer. *Isoprenoid Biosynthesis through the Methylerythritol Phosphate Pathway: The (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl Diphosphate Synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] Protein*. Angewandte Chemie International Edition **41(22)**, 4337–4339 (2002).
- [98] E. Walters, R. Garcia-Serres, G. Jameson, D. Glauser, F. Bourquin, W. Manieri, P. Schurmann, M. Johnson und B. Huynh. *Spectroscopic Characterization of Site-Specific [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] Cluster Chemistry in Ferredoxin:Thioredoxin Reductase: Implications for the Catalytic Mechanism*. Journal of the American Chemical Society **127(26)**, 9612–9624 (2005).
- [99] W. H. Organisation. *Lassa fever*. Fact sheet N° 179 (2005).
- [100] S. Günther und O. Lenz. *Lassa virus*. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences **41(4)**, 339–390 (2004).
- [101] P. N. Barlow, B. Luisi, A. Milner, M. Elliott und R. Everett. *Structure of the C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> Domain by <sup>1</sup>H-nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Journal of Molecular Biology **237**, 201–211 (1994).
- [102] A. Chaudhry. *Purifikation und Ermittlung metallbindender Eigenschaften des Lassa Z Proteins*. Dissertation, Universität zu Lübeck (2007).
- [103] P. Wegner, M. Bever, V. Schünemann, A. X. Trautwein, C. Schmidt, H. Bönisch, M. Gnida und W. M. Klauke. *Iron-Sulfur Proteins Investigated by EPR-, Mössbauer- and EXAFS-Spectroscopy*. Hyperfine Interactions **V156-157(1)**, 293–298 (2004).
- [104] F. Jensen. *Introduction to Computational Chemistry*. Wiley (2003).
- [105] W. Koch und M. C. Holthausen. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*. Wiley-VCH (2000).
- [106] A. D. Becke. *Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior*. Physical Review A **38**, 3098–3100 (1988).
- [107] A. D. Becke. *A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories*. Journal of Chemical Physics **98**, 1372–1372 (1993).
- [108] A. D. Becke. *Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange*. Journal of Chemical Physics **98**, 5648–5652 (1993).

- [109] A. M. Lee, W. Yang und R. G. Parr. *Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density*. Phys. Rev. B **37**, 785–289 (1988).
- [110] P. J. Stephens, J. F. Devlin, C. F. Chabalowski und M. J. Frisch. Phys. Chem. **98**, 11623 (1994).
- [111] A. Schäfer, H. Horn und R. Ahlrichs. *Fully optimized contracted Gaussian basis sets for atoms Li to Kr*. Journal of Chemical Physics **97**, 2571–2577 (1992).
- [112] A. Schäfer, C. Huber und R. Ahlrichs. *Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr*. Journal of Chemical Physics **100**, 5829–5835 (1994).
- [113] A. J. H. Wachters. *Gaussian Basis Set for Molecular Wavefunctions Containing Third-Row Atoms*. The Journal of Chemical Physics **52(3)**, 1033–1036 (1970).
- [114] R. Ahlrichs und *et. al.* *Basissätze von ftp.chemie.uni-karlsruhe.de/pub/basen* (2001).
- [115] K. Nagarajan, A. Chaudhry, L. H. Böttger, W. Meyer-Klauke, S. Günther, C. L. Schmidt und R. Hilgenfeld. *Biochemical and biophysical characterization and initial crystallization of the Z protein from the Lassa virus (Arenaviridae)*. International Workshop on Discovery of Antiviral Compounds, April 26 - 29, 2006 at the Media Docks in Lübeck, Germany (2006).
- [116] C. Schmidt. *persönliche Mitteilung*.
- [117] W. D. Phillips, M. Poe, J. F. Weiher, C. C. McDonald und W. Lovenberg. *Proton Magnetic Resonance, Magnetic Susceptibility and Mössbauer Studies of Clostridium pasteurianum Rubredoxin*. Nature **227**, 574–577 (1970).
- [118] K. K. Rao, M. C. W. Evans, R. Cammack, D. O. Hall, C. L. Thompson, P. J. Jackson und C. E. Johnson. *Mössbauer effect in rubredoxin*. Biochemical Journal **129(5)**, 1063–1070 (1972).
- [119] C. Schulz und P. G. Debrunner. *Rubredoxin, a simple iron-sulfur protein: its spin hamiltonian and hyperfine parameters*. Journal de Physique **37**, C6–153–C6–158 (1976).
- [120] S. J. Yoo, J. Meyer, C. Achim, J. Peterson, M. P. Hendrich und E. Münck. *Mössbauer, EPR, and MCD studies of the C9S and C42S variants of Clostridium pasteurianum rubredoxin and MCD studies of the wild-type protein*. Journal of Biological Inorganic Chemistry **V5(4)**, 475–487 (2000).

- 
- [121] P. Gütlich. *Spin transition in iron(II) complexes induced by heat, pressure, light, and nuclear decay*. Hyperfine Interactions **V33(1)**, 105–132 (1987).
- [122] P. Gütlich, J. Ensling und F. Tuczek. *Metastable electronic states induced by nuclear decay and light*. Hyperfine Interactions **V84(1)**, 447–469 (1994).
- [123] J. Kusz, P. Gütlich und H. Spiering. *Structural Investigations of Tetrazole Complexes of Iron(II)*. Top Curr Chem **234**, 129–153 (2004). Spin Crossover, SCO, Liesst.
- [124] S. Decurtins, P. Gütlich, C. P. Köhler, H. Spiering und A. Hauser. *Light-induced excited spin state trapping in a transition-metal complex: The hexakis(1-propyltetrazole-iron (II) tetrafluoroborate spin-crossover system*. Chemical Physics Letters **105**, 1–4 (1984).
- [125] S. Decurtins, P. Gütlich, K. M. Hasselbach, A. Hauser und H. Spiering. *Light-induced excited-spin-state trapping in iron(II) spin-crossover systems. Optical spectroscopic and magnetic susceptibility study*. Inorganic Chemistry **24**, 2174–2178 (1985).
- [126] A. Hauser, P. Gütlich und H. Spiering. *High-spin - low-spin relaxation kinetics and cooperative effects in the hexakis(1-propyltetrazole)iron bis(tetrafluoroborate) and  $[Zn_{1-x}Fe_x(ptz)_6](BF_4)_2$  ( $ptz = 1$ -propyltetrazole) spin-crossover systems*. Inorganic Chemistry **25**, 4245–4248 (1986).
- [127] P. Gütlich, Y. Garcia und H. A. Goodwin. *Spin crossover phenomena in Fe(II) complexes*. Chemical Society Reviews **29**, 419–427 (2000).



# Liste eigener Veröffentlichungen

In chronologischer Reihenfolge:

- [E1]** C. Jung, F. Lenzian, V. Schünemann, M. Richter, L. H. Böttger, A. X. Trautwein, J. Contzen, M. Galander, D. K. Ghosh, A.-L. Barra. *Multifrequency EPR and Mössbauer spectroscopic studies on freeze-quenched reaction intermediates of nitric oxide synthase*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **43**, S84-S95 (2005)  
<http://dx.doi.org/10.1002/mrc.1694>
- [E2]** C. Jung, V. Schünemann, F. Lenzian, A. X. Trautwein, J. Contzen, M. Galander, L. H. Böttger, M. Richter, A.-L. Barra. *Spectroscopic characterization of the iron-oxo intermediate in cytochrome P450*. *Biological Chemistry* **386**, 1043-1053 (2005)  
<http://dx.doi.org/10.1515/BC.2005.120>
- [E3]** H. Paulsen, P. Wegner, H. Winkler, J. A. Wolny, L. H. Böttger, A. X. Trautwein, C. Schmidt, V. Schünemann, G. Barone, A. Silvestri, G. La Manna, A. I. Chumakov, I. Sergueev, R. Ruffer. *Dynamics of metal centers monitored by nuclear inelastic scattering*. *Hyperfine Interactions* **165**, 17-24 (2005)  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10751-006-9242-4>
- [E4]** G. Barone, L. H. Böttger, J. A. Wolny, H. Paulsen, A. X. Trautwein, A. Silvestri, I. Sergueev, G. La Manna. *Tin-DNA complexes investigated by nuclear inelastic scattering of synchrotron radiation*. *Hyperfine Interactions* **165**, 299-302 (2005)  
<http://dx.doi.org/10.1007/s10751-006-9278-5>
- [E5]** L. H. Böttger, A. I. Chumakov, C. M. Grunert, P. Gütlich, J. Kusz, H. Paulsen, U. Ponkratz, V. Rusanov, A. X. Trautwein, J. A. Wolny. *Spin- and phase transition in the spin crossover complex  $[Fe(ptz)_6](BF_4)_2$  studied by nuclear inelastic scattering of synchrotron radiation and by DFT calculations*. *Chemical Physics Letters* **429**, 189-193 (2006)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2006.08.004>
- [E6]** R. Prakash, R. W. Saalfrank, H. Maid, A. Scheurer, F. W. Heinemann, A. X. Trautwein, L. H. Böttger. *Synthesis and redox properties of mixed-valent*

- octanuclear iron defective hexacubanes and a (CaCl)-C apped body-centered six-sided iron(III) polyhedron*. *Angewandte Chemie International Edition* **45**, 5885-5889 (2006)  
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.200601478>
- [E7]** R. W. Saalfrank, R. Prakash, H. Maid, F. Hampel, F. W. Heinemann, A. X. Trautwein, L. H. Böttger. *Synthesis and characterization of metal-centered, six-membered, mixed-valent, heterometallic wheels of iron, manganese, and indium*. *Chemistry - A European Journal* **12**, 2428-2433 (2006)  
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.200501497>
- [E8]** H. Reents, I. Gruner, U. Harmening, L. H. Böttger, G. Layer, P. Heathcote, A. X. Trautwein, D. Jahn, E. Hartig. *Bacillus subtilis Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state*. *Molecular Microbiology* **60**, 1432-1445 (2006)  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05198.x>
- [E9]** D. Faivre, L. H. Böttger, B. F. Matzanke, D. Schüler. *Intracellular magnetite biomineralization in bacteria proceeds via a distinct pathway involving membrane-bound ferritin and ferrous iron species*. *Angewandte Chemie International Edition*, Manuskript akzeptiert
- [E10]** A. Boughammoura, B. F. Matzanke, L. H. Böttger, S. Reverchon, E. Lesuisse, D. Expert, T. Franza. *Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant pathogenic bacterium Erwinia chrysanthemi 3937*. eingereicht bei The Journal of Bacteriology
- [E11]** C. Teutloff, L. H. Böttger, F. J. Ruiz-Duenas, V. Schünemann, A. X. Trautwein, R. Pogni, R. Basosi, A. T. Martinez, F. Lenzian. *Reaction intermediates of versatile peroxidase from P. eryngii - Combined freeze-quench high field EPR and Mössbauer studies of heme iron states and tryptophan radicals*. Manuskript in Vorbereitung
- [E12]** A. Chaudhry, L. H. Böttger, K. Nagarajan, S. Günther, W. Meyer-Klaucke, R. Hilgenfeld, C. L. Schmidt. *Metal binding properties and oligomeric states of the Lassa virus Z protein*. Manuskript in Vorbereitung
- [E13]** L. H. Böttger, C. M. Grunert, V. Rusanov, P. Gütlich. *Light emitting diodes induced LIESST effect of [Fe(ptz)<sub>6</sub>](BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub> studied by Mössbauer spectroscopy*. Manuskript in Vorbereitung

# Glossar

A	Kernmassenzahl
AAS	<b>A</b> tom <b>A</b> bsorption <b>S</b> pectroscopy
<i>ab, em</i>	Indizes für <b>a</b> bsorbieren und <b>e</b> mittieren
<i>a, g</i>	Indizes für <b>a</b> ngeregt und <b>g</b> rundzustand
$\alpha$	Feinstrukturkonstante $\alpha = \frac{\mu_0 c e^2}{2h} = 7,297351 * 10^{-3}$
$\alpha_{1,2,3}$	Winkel
<i>A, Q</i>	Indizes für <b>A</b> bsorber und <b>Q</b> uelle
<i>B</i>	Magnetfeld
B3LYP	Funktional für DFT-Rechnungen
<i>B<sub>hf</sub></i>	Hyperfeinfeld
<i>c</i>	Vakuumlichtgeschwindigkeit $c = 2,997925 * 10^8 \text{ ms}^{-1}$
CEMS	<b>c</b> onversion <b>e</b> lectron <b>m</b> össbauer <b>s</b> pectroscopy
CHC	C <sub>3</sub> HC <sub>4</sub> : 3 Cysteine, 1 Histidin und 4 Cysteine
<i>C. pasteurianum</i>	Das Bakterium <i>Clostridium pasteurianum</i>
CP(PPP)	Basissatz für DFT-Rechnungen (core properties) mit Polarisationsfunktion
$\delta$	Isomeriewerschiebung
$\Delta_{\text{mamB}}$	nichtmagnetische Mutante des Bakteriums <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
$\Delta_{\text{mamM}}$	nichtmagnetische Mutante des Bakteriums <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
DFT	Dichte-Funktional-Theorie
DMAPP	3,3-Dimethylallyldiphosphat
<i>E</i>	Energie
<i>e</i>	Elementarladung $e = 1,602189 * 10^{-19} \text{ As}$
<i>E. coli</i>	Das Bakterium <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFG	elektrischer Feld Gradient
Eisenpyrit	FeS <sub>2</sub>
$\Delta E_Q$	Quadrupolaufspaltung
ESRF	<b>E</b> uropean <b>S</b> ynchrotron <b>R</b> adiation <b>F</b> acility
$\eta$	Asymmetrieparameter
<i>F</i>	Wahrscheinlichkeit
<i>f*</i>	Debye-Waller-Faktor (Lamb-Mössbauer-Faktor)
Ferrihydrit	FeOOH

---

$\Gamma$ .....	Linienbreite
$\gamma_0$ .....	gyromagnetisches Verhältnis in $\text{A s rad kg}^{-1}$
GcpE .....	Protein des 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweges
GPC .....	<b>g</b> locoprotein <b>p</b> recursor <b>p</b> rotein
Greigit .....	$\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{S}_4$
$h$ .....	Planck-Konstante $h = 6,626176 \text{ Js}$
$\hbar$ .....	Planck-Konstante $\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1,054589 * 10^{-34} \text{ Js}$
HMBPP .....	(E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-enyl-Diphosphat
$I$ .....	Kernspin
IPP .....	Isopentenyl-Diphosphat
$J$ .....	Austauschparameter
$j$ .....	Drehimpulsquantenzahl
$K$ .....	Energie Anisotropie Konstante
$k$ .....	Betrag des Wellenvektors $k = \frac{2\pi}{\lambda}$
$K'$ .....	Federkonstante
$K_{0,1,2,\dots}$ .....	Materialkonstanten
$k_B$ .....	Boltzmannkonstante $k_B = 1,380662 * 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$
$\lambda$ .....	Materialkonstante
$L$ .....	Langrange-Funktion
L-RNA .....	large RNA
LytB .....	Protein des 2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweges
$M$ .....	Magnetisierung (magnetisches Moment pro Volumen)
$m$ .....	magnetische Quantenzahl
$M'$ .....	Atommasse
$M_K$ .....	Masse des Kristallgitters
Mackinawit .....	$(\text{Fe,Ni})_9\text{O}_8$
Maghemite .....	$\text{Fe}_2\text{O}_3$
Magnetit .....	$\text{Fe}_3\text{O}_4$
MAP .....	Acetat-Mevalonat-Syntheseweg
MEP .....	2-C-Methyl-D-Erythritol-Reaktionsweg
<i>M. gryphiswaldense</i> ....	Das Bakterium <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
MIDL .....	magnetisch induzierte differentielle Lichtstreuung
$M_S$ .....	Sättigungsmagnetisierung
MSR-1B .....	nichtmagnetische Mutante des Bakteriums <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
MSR-1 .....	Wildtyp des Bakteriums <i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>
$\mu$ .....	magnetisches Moment
$\mu_0$ .....	Feldkonstante $\mu_0 = 4\pi 10^{-7} \text{ VsA}^{-1}\text{m}^{-1}$
$\mu_0$ .....	Permeabilitätskonstante
$\mu_K$ .....	magnetisches Kernmoment
$N_{a,b,c}$ .....	materialspezifisches Demagnetisierungskonstanten

---

NIS	Nuclear Inelastic Scattering
NP	Nukleoprotein
ORCA	DFT-Programm
$p_{1,2}$	Wahrscheinlichkeiten
<i>P. abyssi</i>	Das Bakterium <i>Pyrococcus abyssi</i>
PDB	<b>p</b> rotein <b>d</b> ata <b>b</b> ank Datenbank
$\Phi$	elektrostatisches Potential
PIXE	<b>P</b> roton <b>I</b> nduced <b>X</b> -ray <b>E</b> mission
$\Psi$	Wellenfunktion
ptz	1-n-propyl-tetrazole
$Q$	Quadrupolmoment des Kernes
$q$	Ladung
$q_{ii}$	Matrixelemente
$r$	Radius
$\langle r^2 \rangle$	Erwartungswert des Radiusquadrates
$\rho$	Kernladungsdichte
$\rho(0)$	Elektronenladungsdichte am Kernort
$\rho_e$	Ladungsdichte der s-Elektronen
RNA	Ribonukleinsäure
$S$	Spin
SDS-PAGE	sodium <b>d</b> odecylsulfate <b>p</b> oly <b>a</b> crylamide <b>g</b> el <b>e</b> lectrophoresis, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
$\sigma$	Stress
$\sigma_s$	magnetisches Moment pro Masse
S-RNA	short RNA
SV(P)	Basissatz für DFT-Rechnungen mit Polarisationsfunktion
$T$	Temperatur
$\tau$	mittlere Lebensdauer
$T_C$	Curie-Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
$\Theta$	Debye-Temperatur
$\theta$	Winkel
$T_V$	Verwey-Temperatur
TZV(P)	Basissatz für DFT-Rechnungen (triple zeta) mit Polarisationsfunktion
$V$	Wechselwirkungsenergie
$v$	Geschwindigkeit
$\rho$	Dichte
$V_I$	Wechselwirkungsenergie der Isomerieverschiebung
$V_{ii}$	Komponenten des EFG-Tensors
$V_Q$	Wechselwirkungsenergie der Quadrupolaufspaltung
Z	Kernladungszahl



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Magnetische Energie von Nanoteilchen im Magnetfeld . . . . .	15
3.1	EM Bild von <i>M. gryphiswaldense</i> . . . . .	22
3.2	Kristallstruktur von Magnetit . . . . .	24
3.3	Mössbauerspektrum der Probe DF23 bei T=130 K . . . . .	26
3.4	Funktionsprinzip der MIDL . . . . .	29
3.5	Fit der MIDL Messung I . . . . .	31
3.6	Fit der MIDL Messung II . . . . .	32
3.7	Gauß-Verteilung aus dem Fit II . . . . .	32
3.8	Fit der Magnetosom-Entfernung . . . . .	34
3.9	Elektronenmikroskopaufnahmen . . . . .	35
3.10	TEM und Holographie . . . . .	37
3.11	TEM-Holographie einer Magnetosomenkette . . . . .	38
3.12	Mössbauerspektren der Wachstumsserie I . . . . .	39
3.13	Mössbauerspektren der Wachstumsserie II . . . . .	40
3.14	Einzelpektren der Wachstumsserie . . . . .	42
3.15	Einzelpektren der Wachstumsserie . . . . .	43
3.16	Wachstumskurven des Magnetitanteils . . . . .	45
3.17	Verlauf des Hyperfeinfeldes in der Wachstumsserie . . . . .	45
3.18	Verlauf des Hyperfeinfeldes bezüglich der Teilchendurchmesser . . . . .	46
3.19	Verlauf des Hyperfeinfeldes in der Wachstumsserie (Model 1) . . . . .	47
3.20	Verlauf des magnetischen Feldes zwischen zwei Magnetosomen . . . . .	48
3.21	Modell 2 . . . . .	50
3.22	Modell 2: Teilchenzahlzunahme . . . . .	51
3.23	Vergleich zwischen Kristall- und Interaktionsanisotropie I . . . . .	52
3.24	Vergleich zwischen Kristall- und Interaktionsanisotropie II . . . . .	53
3.25	isolierte Magnetosomen T=130 K . . . . .	54
3.26	Spektren der isolierten Magnetosomen (T=77 K und 240 K) . . . . .	54
3.27	Spektren des Sediments aus DF23 . . . . .	55
3.28	Mössbauerspektren des Überstandes der 100 kDa Membran, DF23 . . . . .	55
3.29	Mössbauerspektrum der Probe MDC2 bei T=77 K . . . . .	57
3.30	Mössbauerspektren der Probe MDC3 . . . . .	57
3.31	Native Gel-Elektrophorese der Fraktionen . . . . .	59
3.32	SDS-PAGE Gel-Elektrophorese der Fraktionen . . . . .	60

3.33	CEMS-Spektrum Magnetosomen . . . . .	61
3.34	CEMS Magnetosom Spektrum nach Luftkontakt . . . . .	62
3.35	Vergleich zwischen CEMS und Transmissionsspektrum der Magnetosomen . . . . .	63
3.36	Transmissionsspektrum der gealterten Magnetosomen Probe . . . . .	63
3.37	Mössbauerspektren der Wachstumsreihen der $\Delta$ mamM und $\Delta$ mamB Mutanten . . . . .	65
3.38	Spektrum der Probe DF01 bei T=130 K . . . . .	66
3.39	Spektrum der Probe DF03 bei T=130 K . . . . .	67
3.40	Mössbauerspektren der Proben DF40, DF41, DF42 . . . . .	68
3.41	Modell der Magnetosomenstehung . . . . .	72
4.1	Reaktionspfad der 2-C-Methyl-D-Erythritol-Synthese . . . . .	74
4.2	Mössbauerspektren des rekonstituierten Proteins GcpE . . . . .	75
4.3	Mössbauerspektren der ganzen Zellen mit überexprimierten Protein GcpE . . . . .	77
4.4	Mössbauerspektren des isolierten Proteins GcpE . . . . .	78
4.5	Mössbauerspektren des rekonstituierten Proteins LytB . . . . .	79
4.6	Mössbauerspektren der ganzen Zellen mit überexprimiertem Protein LytB . . . . .	80
4.7	Mössbauerspektren des isolierten Proteins LytB . . . . .	81
4.8	Mössbauerspektren des isolierten Proteins LytB . . . . .	82
5.1	Struktur des Lassa Z-Proteins des Pferdeherpesvirus . . . . .	86
5.2	Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins . . . . .	88
5.3	Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins . . . . .	89
5.4	Spektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins bei T=4,2 K . . . . .	90
5.5	Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins bei T=85 K . . . . .	91
5.6	Mössbauerspektrum des mit Zn versetzten oxidierten Lassa Z-Proteins bei T=85 K . . . . .	92
5.7	Mössbauerspektrum des mit Zn versetzten reduzierten Lassa Z-Proteins . . . . .	92
5.8	Zentren des Pferdeherpes-Virus . . . . .	94
5.9	Oberfläche des Pferdeherpes-Virus Z-Proteins . . . . .	97
5.10	Modell des dritten Bindungsplatzes am Z-Protein des Lassa Virus . . . . .	98
A.1	Spincrossoverkomplex $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ . . . . .	110
A.2	LIEST-Effekt am $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ -System . . . . .	111
A.3	LIEST-Effekt am $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ -System (II) . . . . .	113
A.4	LIEST-Effekt am $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ -System (II) . . . . .	114
A.5	Korrelation Messzeit - high-spin Anteil bei $(\text{Fe}(\text{ptz})_6)(\text{BF}_4)_2$ . . . . .	115
A.6	Komplex $(\text{PPh}_4)(\text{Fe}^{3+} \subset (\text{Fe}_2^{3+}\text{Mn}_4^{2+}\text{Cl}_6(\text{L}^1)_6))$ . . . . .	116
A.7	Komplex $\text{Fe}_4^{\text{II}}\text{Fe}_4^{\text{III}}(\text{L}^3)_6\text{Cl}_4\text{O}_2$ . . . . .	116

A.8	Komplex $\text{Na}_3\text{-(Fe}_9^{\text{III}}(\text{L}^3)_8\text{Cl}_4\text{O}_6(\text{CaCl}_2))$ . . . . .	117
B.1	Vergrößerung der Probe DF19 bei $T=130\text{ K}$ . . . . .	120
B.2	Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins . . . . .	120
B.3	Mössbauerspektrum des oxidierten Lassa Z-Proteins mit Zink-Anteil .	121
B.4	Mössbauerspektrum des reduzierten Lassa Z-Proteins mit Zink-Anteil	121



# Tabellenverzeichnis

3.1	Tabelle der untersuchten Proben . . . . .	28
3.2	Durchschnittliche Entfernung und Durchmesser der Magnetosomen .	33
3.3	Hyperfeinfelder und Flächenanteile der Simulationen der Wachstums- serie . . . . .	41
3.4	Parameter der Simulationen der Wachstumsserie . . . . .	41
3.5	Parameter der CEMS-Spektren . . . . .	64
5.1	Verwendete Proben des Lassa Virus Z-Proteins . . . . .	87
5.2	Zusammenfassung der Ergebnisse der Mössbauer Messungen am Z- Protein des Lassa Virus . . . . .	90
5.3	Ergebnisse der DFT-Rechnungen an dem Pferdeherpes-Virus . . . . .	95
5.4	Ergebnisse der DFT-Rechnungen an den Bakterien <i>C. pasteurianum</i> und <i>P. abyssi</i> . . . . .	99
5.5	Mössbauerparameter für verschiedene Rubredoxine aus der Literatur .	100



# Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei all denjenigen bedanken, die mir mit Hilfe und Ratschlägen zur Seite standen.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Alfred X. Trautwein. Zum einen für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, zum anderen für die vielfältigen Weiterbildungs- und Forschungsreisen, die wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei PD Dr. Hauke Paulsen für die Betreuung dieser Arbeit und die Einführung in die Geheimnisse der DFT-Rechnungen, welche entscheidenden Einfluss auf das Gelingen dieser Arbeit hatten. Auch gilt mein Dank für die Vielzahl von hilfreichen Anmerkungen, Diskussionen, Ratschlägen und die Hinweise zum Gestalten dieser Arbeit.

Bei Prof. Christian Hübner, für die Einführung in die Einzelphotonenspektroskopie und die Möglichkeit diese Arbeit zu einem Abschluss zu führen.

Prof. Volker Schünemann gilt mein Dank für die Einführung in die Mössbauerspektroskopie und die zahlreichen Diskussionen, Tipps und Hinweise.

Bei PD Heiner Winkler für die Vielzahl von Ratschlägen und Anmerkungen, sowie für das Korrekturlesen.

Meinen ausdrücklichen Dank möchte ich Herrn Manfred Mischok aussprechen, dessen Hilfe beim Umgang und Füllen von Stickstoff und Helium nicht wegzudenken ist.

Herrn Karl-Heinz Finder für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft beim Lösen (Reparieren) von elektronischen Problemen und für die vielen gemeinsamen Stunden beim Ultraschallversuch.

Dana, Verena, Henning und Richard (Vielen Dank für die  $\LaTeX$ -Tipps!) für die sehr gute Atmosphäre.

Dr. A. Sawaryn für die Unterstützung und Einführung in den Umgang mit dem Rechencluster und für den unermüdlichen Einsatz als Administrator.

Bei Ute Baumhöver für ihren Einsatz bei der Bestellung von Literaturzitatzen. Herrn Gerdan für seine Unterstützung bei technischen Fragen.

## Danksagung

---

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. H. P. Gunnlaugson von der Univesität Århus für die angepasste Version des Programms Vinda und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe die Konversions-Elektronen-Mössbauerspektroskopie durchzuführen.

Bei PD Christian Schmidt aus dem Biochemischen Institut der Universität Lübeck für die zahlreichen Diskussionen über Proteinstruktur und Bindungsplätze des Z-Proteins des Lassa Virus.

Der Gruppe um Prof. M. Rohmer und Dr. M. Seemann für die Proben des GcpE's und LytB's.

Mein Dank richtet sich auch an Dr. Damien Faivre für die Bereitstellung der Proben von *Magnetospirillum gryphiswaldense* sowie Prof. Dirk Schüler für die anregenden Diskussionen über den Organismus.

Prof. Berthold F. Matzanke-Markstein für die ausführlichen Diskussionen über *Magnetospirillum gryphiswaldense* und Magnetosomen, die Hilfestellungen, Lösungsvorschläge und das Korrekturlesen, sowie die gute Zusammenarbeit. Auch sei hier ein Dank an J. Schorch ausgesprochen für die biochemische Auftrennung der Proben.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Ventzi Rusanov für seine ausführlichen Erklärungen, seine motivierende Art und die zahlreichen Stunden im ESRF. Die Autofahrt dorthin bleibt unvergessen.

Ein weiterer Dank soll den Gruppen um Prof. Gütlich, Prof. Saalfrank und Prof. Rüffer gelten. Namentlich seinen hier genannt Dr. Kusz, Dr. Chumakov, Dr. Ponkratz, Dr. Stan-  
kov, Dr. Grunert und Dr. Prakash.

Ein Dank an Axel Schiller für die Möglichkeit, die Lehrtätigkeit an der MTA-Schule auszuüben. Hier sei auch Prof. Bergmann von der FH Lübeck gedankt für die Übertragung der Lehrtätigkeit im Onlinestudiengang Medieninformatik sowie Prof. Brunn für die Möglichkeit, die Vorlesung in Experimentalphysik I zu halten.

Meiner Familie und meinen Freunden für ihren sozialen Rückhalt, der mich durch Studium und Promotion begleitet hat. Meinen Eltern Wulf und Inge Böttger und meiner Schwester Maren, sowie Björn Limmer möchte ich an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich für das Korrekturlesen danken. Meiner Großmutter Mariechen Böttger für ihre Unterstützung während meiner Studien- und Promotionszeit.

Ein herzliches Dankeschön geht an Michaela Stoffers für ihre Motivation und Hilfe.